

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

PATRICIA COELHO DE VELASCO

**IMPACTO DA RESTRIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS NA
MANUTENÇÃO DAS CONEXÕES RETINOTECTAIS DE ROEDORES**

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM NEUROCIÊNCIAS

Niterói

1º semestre / 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

PATRICIA COELHO DE VELASCO

**IMPACTO DA RESTRIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS NA
MANUTENÇÃO DAS CONEXÕES RETINOTECTAIS DE ROEDORES**

Dissertação submetida ao curso de pós-graduação em Neurociências do Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Neurociências. Área de concentração: Neurobiologia.

Orientador: Profº Dr. Claudio Alberto Serfaty

Niterói

1º semestre / 2009

V 433 Velasco, Patrícia Coelho de

Impacto da restrição de ácidos graxos essenciais na manutenção das conexões retinotectais de roedores./ Patrícia Coelho de Velasco.—Niterói,RJ : [s.n.], 2009.
xxf.

Dissertação—(Mestrado em Neuroimunologia)—Universidade Federal Fluminense, 2009.

1. Projeção retinotectal. 2. Plasticidade – Sistema visual. 3. Colículo superior. 4. Deficiência nutricional. I. Título.

CDD. : 591.48

PATRICIA COELHO DE VELASCO

IMPACTO DA RESTRIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS NA
MANUTENÇÃO DAS CONEXÕES RETINOTECTAIS DE ROEDORES

Dissertação submetida ao curso de pós-graduação em Neurociências do Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Neurociências. Área de concentração: Neurobiologia.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Daniela Uziel Rosental
UFRJ

Prof. Dr. Priscilla Oliveira Silva
UFF

Prof. Dr. Regina Célia Cussa Kubrusly
UFF

Prof. Dr. Paula Campello-Costa Lopes (Revisora e Suplente)
UFF

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Plasticidade Neural, do Programa de Neurociências do Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense sob a orientação do Profº Claudio Alberto Serfaty e na vigência de auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e PRONEX.

“Tenho em mim todos os sonhos do mundo”
Fernando Pessoa

Mais uma vez,
à minha avó, Irene Gonçalves,
minha alma gêmea, meu amor eterno.
Muitas Saudades.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer a Deus por me permitir completar mais uma etapa da minha vida, me dando força e coragem para enfrentar cada momento rumo a minha vitória.

Agradeço especialmente aos meus pais e a meu irmão Leonardo, por todo o amor, dedicação e apoio durante a caminhada pela conclusão do mestrado. Por agüentarem todos os meus ataques de stress, os estudos nas madrugadas que faziam com que minha mãe me acompanhasse nos lanches às 3 da manhã. Com certeza, cada gesto de carinho recebido nos momentos mais importantes significou o suporte necessário para se enfrentar todos os desafios.

A meu orientador, Claudio Alberto Serfaty, pela dedicação e a paciência com as quais me recebeu em seu laboratório, por acreditar na minha capacidade e me instigar a alcançar objetivos cada vez mais altos. Os conhecimentos transmitidos jamais serão esquecidos e servirão de base para as minhas conquistas futuras. O Claudio é mais que orientador, é um amigo querido.

Agradeço também às professoras Paula Campello-Costa e Adriana Melibeu, amigas queridas e especiais que me acompanharam todo esse período contribuindo para o meu conhecimento e crescimento como pessoa. À professora Priscila Oliveira Silva, espetáculo, queridíssima, quero para sempre como amiga. Aos professores Ronald Marques e Francisco Abreu, que acompanharam de perto as minhas conquistas, presentes sempre que precisei.

A toda a minha ENORME família, no tamanho e no coração, por cada minuto de companheirismo, cada palavra amiga na hora mais necessária. Agradeço aos primos André, Marcelo, Carol, Vanessa, Alexandre, Gabriela, Sandra, Cristine, minha afilhadinha Natália. A minha prima Ana Lúcia, que mesmo distante, não poderia estar mais perto. Amo essa vencedora e quero ser ela quando crescer. Não posso esquecer os pequenos, que amo de paixão. Aproveitando, agradeço a minha “cunhadinha” Carol, psicóloga, amiga... ahh, irmã também, né??

Agradeço também ao mais recente Mestre em Educação, meu namorado Jefferson da Costa Soares, por estar sempre presente durante mais esta jornada,

por acreditar em mim mais do que ninguém, por ter paciência e me compreender quando mais precisei, por treinar comigo as apresentações, por todos os conselhos. Obrigada por nunca duvidar do que eu sou capaz.

Aos meus amigos do laboratório, por todo o carinho com que me receberam e pela ajuda que me foi dedicada para a realização durante todo o mestrado. Cada pedacinho deste trabalho tem um pouco do carinho da Rachel, da alegria da Aninha, da dedicação do Pablo, da doçura da “Sheilita”, do companheirismo rubro-negro do Henrique, da amizade da Letícia, do divertidíssimo trio Flávio, Carlos e Wandilson. Carol e Nat da iniciação científica. Agradeço especialmente à minha amiga e companheira no projeto, Patrícia Rung, mais que importante na realização desse trabalho. À Tita, por toda a sua dedicação e carinho. Ao Alecsandro e ao Seu Bernardino, pois sem eles não poderia realizar um tratamento tão prolongado com dietas tão diferentes.

Às minhas amigas nutricionistas (e amigos nutricionistas também, mesmo que poucos!), que enfrentaram comigo toda a graduação, acompanharam com orgulho minhas conquistas e tenho certeza que agora compartilham minha felicidade. Os sorrisos, conversas, e muitos momentos de alegria jamais serão esquecidos. Tati, Flávia, Raquelzinha... Nosso quarteto será fantástico sempre!!!

Aos meus amigos do Andrews, que entenderam cada ausência minha, e que algumas vezes, mesmo distantes, torceram pelo meu sucesso. À panela Bia, Guilherme, Rafael, Peter, Cyntia e Flávia (duas vezes, hein? rsrs)

Finalmente, quero fazer um agradecimento mais do que especial à professora e nutricionista, Mônica Valle de Carvalho, por tudo o que me proporcionou durante a minha vida acadêmica, por acreditar na minha formação e na minha capacidade, por investir em mim. Obrigada por todo carinho, como minha professora, orientadora, amiga, e por me ensinar o valor da Nutrição, e que o profissional nutricionista é capaz de içar vôos altos.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	O SISTEMA VISUAL.....	17
1.2	COLÍCULO SUPERIOR.....	18
1.3	O MAPA RETINOTÓPICO.....	20
1.4	O DESENVOLVIMENTO DAS PROJEÇÕES RETINOTECTAIS.....	22
1.5	MECANISMOS INDEPENDENTES DE ATIVIDADE ELÉTRICA.....	24
1.6	MECANISMOS DEPENDENTES DE ATIVIDADE ELÉTRICA.....	26
1.6.1	Papel dos Receptores para Glutamato	28
1.7	PERÍODO CRÍTICO E PLASTICIDADE NO SISTEMA NERVOSO.....	30
1.8	PAPEL DOS MENSAGEIROS RETRÓGRADOS.....	34
1.9	ASPECTOS NUTRICIONAIS NO DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO.....	35
1.10	ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS.....	36
1.10.1	Ácidos Graxos Essenciais e Plasticidade Sináptica	43
2	OBJETIVOS	46
2.1	Objetivo Geral	46
2.2	Objetivos Específicos	46
3.0	METODOLOGIA	48
3.1	Dietas	48
3.2	Tratamento dos animais	50
3.3	Estudo anterógrado das projeções retinotectais: injeção intraocular de peroxidase (HRP 30%)	51
3.4	Estudo da plasticidade retinotectal em um modelo de lesão de retina temporal	52
3.5	Perfusão e fixação	52
3.6	Processamento histológico para HRP	53
3.7	Análise das amostras	54
3.8	Western Blotting	57
3.9	Análise estatística dos resultados	59
4	RESULTADOS	60
4.1	Efeitos da Restrição de Ácidos Graxos Essenciais (AGE) na manutenção das conexões no sistema retinotectal em animais adultos jovens	60

4.2	Efeitos da Restrição de Ácidos Graxos Essenciais (AGE) na manutenção das conexões no sistema retinotectal em animais na 6ª semana pós-natal (adultos).....	65
4.3	Análise da Região Caudal do Colículo Superior dos Animais DPN28 e DPN42.....	69
4.4	Efeitos da Restrição Nutricional dos AGEs na reorganização das projeções ipsolaterais na plasticidade induzida por lesão de retina.....	70 75
4.5	Avaliação da expressão das subunidades do receptor AMPA no colículo superior dos animais alimentados com as dietas AGE+ e AGE-.....	78
4.6	Papel dos ácidos graxos essenciais na modulação da expressão da proteína associada ao crescimento GAP-43.....	
5	DISCUSSÃO	80
5.1	RESTRIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS ALTERA A TOPOGRAFIA RETINOTECTAL.....	80
5.2	EFEITOS DOS ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS EM UM MODELO DE LESÃO.....	83
5.3	PAPEL DOS LIPÍDIOS BIOATIVOS NA PLASTICIDADE SINÁPTICA	85
5.4	RESTRIÇÃO NUTRICIONAL DE AGEs E IMPACTO NA EXPRESSÃO DAS SUBUNIDADES GLUR1 E GLUR2 DOS RECEPTORES AMPA.....	89
5.5	EFEITOS DOS AGEs NA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA GAP-43 FOSFORILADA (pGAP-43)	91
6	CONCLUSÕES	95
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 Esquema mostrando a formação do nervo óptico e a representação dos centros visuais primários
- FIGURA 2 Representação da estrutura laminar do colículo superior
- FIGURA 3 Representação do sistema visual de mamíferos
- FIGURA 4 Esquema representativo da topografia retinotectal
- FIGURA 5 Fotomicrografias de campo escuro do colículo superior demonstrando a formação da topografia retinotectal
- FIGURA 6 Figura esquemática do direcionamento axonal mediado por efrinas
- TABELA 1 Períodos Críticos de Desenvolvimento do SNC
- FIGURA 7 Formação das colunas de dominância ocular
- FIGURA 8 Efeitos da lesão de retina temporal no colículo superior
- FIGURA 9 Esquema de alongação e dessaturação dos ácidos graxos das famílias n-3 e n-6
- FIGURA 10 Essencialidade dos ácidos graxos essenciais
- FIGURA 11 Esquema mostrando a síntese de eicosanóides
- FIGURA 12 Papel da via de ácido araquidônico na manutenção da organização de topografia retinotectal
- TABELA 2 Componentes básicos das dietas do grupo controle e grupo restrição
- TABELA 3 Composição centesimal das dietas utilizadas no tratamento dos animais
- FIGURA 13 Representação dos três tipos de dietas utilizados e seus respectivos grupos experimentais
- FIGURA 14 Representação esquemática das análises realizadas
- TABELA 4 Composição do tampão de Homogeneização
- TABELA 5 Relação de anticorpos utilizados
- FIGURA 15 Fotomicrografias de campo escuro de cortes coronais de colículo superior (CS) de ratos DPN28 demonstrando os efeitos da restrição nutricional de ácidos graxos essenciais

- FIGURA 16 Análises quantitativas dos efeitos dos ácidos graxos essenciais na estabilização das projeções ipsolaterais no colículo superior de animais DPN28
- FIGURA 17 Fotomicrografias de campo escuro de cortes coronais de colículo superior (CS) de ratos DPN42
- FIGURA 18 Histograma representando as análises dos efeitos dos ácidos graxos essenciais na estabilização das projeções ipsolaterais no colículo superior de animais DPN42
- FIGURA 19 Efeitos da restrição de ácidos graxos essenciais na região caudal do colículo superior (CS) de animais adultos
- FIGURA 20 Efeitos da restrição nutricional de ácidos graxos essenciais na reorganização das projeções ipsolaterais em um modelo de lesão
- FIGURA 21 Análise da densidade óptica da região subpial do colículo superior (CS)
- FIGURA 22 Histogramas demonstrando o efeito da restrição de ácidos graxos essenciais na reorganização das projeções retinotectais após lesão de retina
- FIGURA 23 Efeitos da restrição de ácidos graxos essenciais na expressão da subunidade GluR1 do receptor AMPA
- FIGURA 24 A restrição de ácidos graxos essenciais na expressão da subunidade GluR2 do receptor AMPA
- FIGURA 25 Restrição nutricional crônica de ácidos graxos essenciais na expressão de GAP-43 fosforilada (pGAP-43)
- FIGURA 26 Representação da atividade retrógrada dos ácidos graxos essenciais e dos principais derivados lipídicos

LISTA DE ABREVIATURAS

ω -3	Omega-3
ω -6	Omega-6
AA	Ácido araquidônico
AGEs	Ácidos graxos essenciais
(AGE+)	Grupo controle com alimentação rica em ácidos graxos essenciais
(AGE-)	Grupo restrição com alimentação ausente em ácidos graxos essenciais
AGMI	Ácidos graxos monoinsaturados
AGPI	Ácidos graxos poliinsaturados
AIN-93	American Institute of Nutrition Rodent Diets
AMPAR	Receptor do tipo α amino-5-metil-4-isoxalona propionato
APV	2-amino-5-fosfovalerato
Ca ²⁺	Cálcio
CGR	Células ganglionares da retina
COX	Ciclooxigenase
COX-2	Ciclooxigenase 2
CS	Colículo superior
DHA	Ácido docosahexaenóico
DGLA	Ácido dihomogamalinolênico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNQX	6,7-Dinitroquinoxaline-2,3-dione
DO	Densidade óptica
DPN	Dia pós-natal
E14-E22	Dia embrionário 14 a dia embrionário 22
EPA	Ácido eicosapentaenóico
GAP-43	Proteína associada ao crescimento neurítico de 43kDa
HRP	Peroxidase da raiz forte
IC	Região intercluster
LOX	Lipooxigenase
LTP	Potenciação de longa duração

LTD	Depressão de longa duração
MDR	Molécula de direcionamento repulsivo
MMP-9	Metaloproteinase-9
n-3	Omega-3
n-6	Omega-6
NGL	Núcleo geniculado lateral
NMDAR	Receptor para N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
PAF	Fator de ativação plaquetária
pGAP-43	GAP-43 fosforilada
PG	Prostaglandina
PGE2	Prostaglandina E2
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
PLA2	Fosfolipase A2
PPSEs	Potenciais pós-sinápticos excitatórios
RNA	Ácido ribonucléico
SGS	Stratum griseum superficiale
SGS-I	Região intermediária do SGS
SGI	Stratum griseum intermediale
SNC	Sistema nervoso central
SO	Stratum opticum
SZ	Stratum zonale
TMB	Tetrametilbenzidina
TTX	Tetrodoxina
VCT	Valor Calórico Total

RESUMO

O desenvolvimento dos circuitos sensoriais ocorre durante um período crítico onde a eliminação de sinapses inapropriadas e o remodelamento sináptico dão origem a mapas de representação da topográfica. Estes mapas representam circuitos neurais que são mantidos por meio de mecanismos que interferem com a estabilidade de sinapses. Dentre estes, os ácidos graxos essenciais (AGEs) se destacam como precursores de mensageiros retrógrados e que influenciam sistemas de sinalização e regulam a síntese e liberação de neurotransmissores. O ácido linoleico (ω -6) e o ácido α -linolênico (ω -3) são considerados essenciais, visto que a única fonte disponível é o consumo dietético. Esses ácidos são precursores de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) de cadeia longa, como o ácido araquidônico (AA) e o ácido docosahexaenóico (DHA), os quais são acumulados durante o período fetal e no desenvolvimento infantil. Neste estudo, buscamos avaliar os efeitos da restrição neonatal de AGEs na formação e estabilização das conexões no sistema visual. Fêmeas de ratos pigmentados foram alimentadas por 5 semanas antes do acasalamento com uma dieta controle (óleo de soja) ou com uma dieta restrita em AGEs (óleo de coco). Após o nascimento, a ninhada foi alimentada até o dia pós-natal 28 (DPN28) ou DPN42, quando receberam uma injeção intraocular de HRP. A fim de avaliar o potencial de reorganização e estabilidade dos axônios visuais, um grupo recebeu uma lesão na periferia temporal da retina em DPN21. A restrição de AGEs produziu um aumento significativo na densidade óptica nas camadas superficiais do colículo superior, como resultado do espalhamento de marcação axonal externo às principais zonas terminais. Na região intermediária do stratum griseum superficial (SGS), observamos um aumento na densidade óptica de fibras em DPN28 e em DPN42. Também foi observado aumento na densidade de fibras na região ventral das camadas visuais, indicando assim um espalhamento intralaminar destes axônios. Após a lesão de retina contralateral, o grupo restrito em AGEs demonstrou aumento no brotamento de axônios intactos no sítio de lesão, quando comparado com o grupo controle. Além disso, a restrição de AGEs diminuiu a expressão de pGAP-43 e aumentou a expressão das subunidades GluR1 e GluR2 do receptor glutamatérgico AMPA. Os dados indicam que a restrição nutricional de AA e DHA induz o rompimento na organização topográfica e aumenta a capacidade plástica dos axônios retinianos, consistente com o papel dos AGEs como precursores de moduladores sinápticos envolvidos na estabilização de conexões no sistema visual adulto.

Palavras-chaves: ácidos graxos essenciais; mensageiros retrógrados; sistema retinotectal; plasticidade sináptica;

ABSTRACT

The development of sensory systems occurs during a critical period when extensive axonal elimination and synaptic plasticity are involved in the formation of topographical maps. Among the mechanisms of synaptic maintenance, essential fatty acids (EFAs) appear as important retrograde messengers, affecting signaling transduction systems and regulating neurotransmitter synthesis and release. Linoleic acid (ω -6) and α -linolenic (ω -3) are considered EFAs, since the dietary intake is the only source available. These acids are precursors of long chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA), such as arachidonic acid (AA) and docosahexaenoic acid (DHA), which are accumulated during fetal period and neonatal development. In the present study, we tested the effect of EFAs restriction in the long-term stabilization of connections in the visual system. Female pigmented rats were fed during 5 weeks before mating with either a control (soy oil) or a restricted (coconut oil) diet. After birth, litters were fed until postnatal day 28 (PND 28) or PND 42 when they received an intraocular injection of HRP. Another group received a single retinal lesion at the temporal periphery at PND 21. EFAs restriction produced a significant increase in the optical density in the superficial layers of the superior colliculus, as a result of axonal sprouting outside the main terminal zones. In the intermediate aspect of the stratum griseum superficial (SGS) we observed an increase in optical density of fibers at PND 28 and in PND 42. We also observed increased fiber density in the ventral region of the visual layers indicating an intralaminar sprouting as well. After a contralateral retinal lesion, the EFAs restricted group displayed increased sprouting of intact axons at the lesion site as compared with the control group. Moreover, EFAs restriction decreased pGAP-43 expression and increased GluR1 and GluR2 subunits expression of the glutamate AMPA receptor. The data indicate that food restriction of AA and DHA induces a disruption in the topographical map organization and enhanced sprouting capacity of retinal axons, consistent with a role for EFA as precursors of stabilizing synaptic agents in the visual system of adult rats.

Key words: essential fatty acids; retrograde messengers; retinotectal system; synaptic plasticity;

1 INTRODUÇÃO

O cérebro em desenvolvimento depende, para a sua correta maturação de uma seqüência de fenômenos como a proliferação celular, migração e diferenciação, crescimento de prolongamentos neurais e formação de sinapses, além de eventos que vão desde a eliminação programada de parte das células inicialmente geradas, até a eliminação de axônios transitórios e restrição sináptica. Estes processos determinarão a especificação dos circuitos neurais responsáveis pela percepção dos sentidos e a coordenação dos sistemas motores e cognitivos que caracterizam o sistema nervoso maduro (Shatz, 1992). Portanto, o desenvolvimento dos sistemas sensoriais passa pela formação adequada dos circuitos neurais, cujas conexões adquirem, no decorrer do desenvolvimento pós-natal, um alto padrão de especificidade topográfica, uma condição essencial para o processamento adequado de suas funções (Serfaty & Campello-Costa, 2008).

Uma das características mais notáveis dos sistemas sensoriais é a sua capacidade de representação da superfície receptora no tecido neural, através do ordenamento adequado entre axônios originados de regiões vizinhas. A organização das conexões em mapas topográficos é comum e pode ser observada em mapas sensoriais somestésicos, mapas tonotópicos (para estímulos auditivos) e mapas referentes ao campo visual (Lemke & Reber, 2005; McLaughlin & O'Leary, 2005).

Durante o desenvolvimento de conexões, geralmente os axônios ultrapassam longas distâncias e altera suas direções inúmeras vezes antes de alcançarem seus alvos apropriados (Garel & Rubenstein, 2004). Portanto,

mecanismos que envolvam o direcionamento axonal com o conseqüente refinamento das conexões são necessários durante os processos de formação e maturação cerebral (Chandrasekaran *et al.*, 2005).

Um dos modelos que vem sendo extensamente utilizados para o estudo dos mecanismos que contribuem para um ordenamento preciso das conexões é o sistema visual de mamíferos e animais não-vertebrados. Este sistema apresenta padrões de laminação e segregação de populações neuronais que se assemelham aos padrões encontrados em outras regiões do SNC (Simon & O'Leary, 1992; Goodhill & Richards, 1999; Yates *et al.*, 2001).

1.1 O sistema visual

No sistema visual, as projeções visuais primárias oriundas das células ganglionares da retina (CGR) se dirigem ao tecto óptico (no caso de peixes, anfíbios e aves) ou ao núcleo geniculado lateral dorsal (NGL) e colículo superior (no caso de mamíferos). Os axônios das CGR provenientes dos dois olhos formam os nervos ópticos e se projetam em direção a base do mesencéfalo, onde cruzam a linha média no quiasma óptico, de modo a alcançarem o encéfalo através do trato óptico. É no quiasma óptico que ocorre em mamíferos, a decussação parcial das projeções originadas da retina nasal. Já os axônios da retina temporal se projetam de forma ipsolateral. A decussação parcial permite que cada lado do cérebro processe as informações de ambas as retinas no hemisfério visual contralateral. A proporção de células com projeção ipsolateral e contralateral pode variar entre as espécies. (Schmidt & Tieman, 1985; Garel & Rubenstein,

2004). No caso de roedores e outras espécies que apresentam olhos lateralizados, 95% das projeções cruzam a linha média e projetam para o lado contralateral, enquanto os 5% das projeções restantes se mantêm ipsilateralmente (Linden & Perry, 1983).

Após atravessarem o quiasma óptico, as projeções das CGR rumam em direção aos alvos visuais subcorticiais, onde vão estabelecer seus contatos sinápticos de forma ordenada em camadas visuais específicas (FIGURA 1).

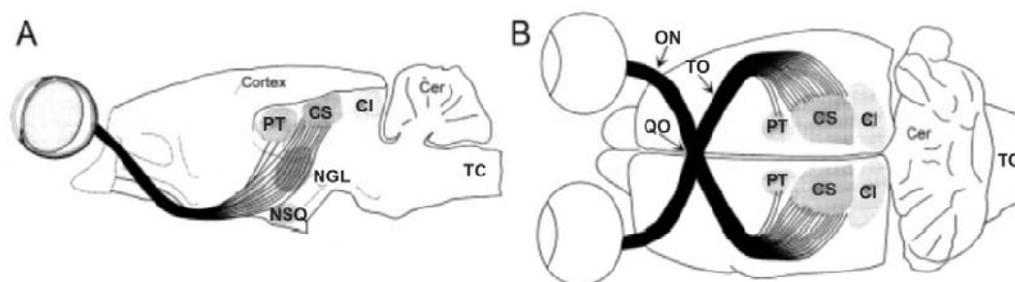


FIGURA 1: Esquema demonstrando a formação do nervo óptico pelas células ganglionares da retina e a representação dos centros visuais primários em ratos. Axônios das células ganglionares da retina terminam principalmente no colículo superior. Abreviaturas: nervo óptico (ON), quiasma óptico (QO), trato óptico (TO), pré-tectum (PT), colículo superior (CS), núcleo supraquiasmático (NSQ), núcleo geniculado lateral (NGL), colículo inferior (CI), cerebelo (Cer), tronco cerebral (TC). Adaptado de Heiduscha & Thanos, 2000.

1.2 Colículo superior

O colículo superior (CS) é um dos principais centros visuais subcorticiais em mamíferos, sendo suas funções mais definidas a integração visuomotora e o controle dos movimentos sacádicos (Isa & Saito, 2001; Nakahara *et al.*, 2006). Em roedores, o CS constitui-se o principal alvo retiniano, visto que todas as células ganglionares da retina (CGR) estendem seus axônios para este núcleo visual (Linden & Perry, 1983).

Com relação a sua localização neuroanatômica, o CS encontra-se no tecto do mesencéfalo e apresenta um padrão de organização laminar disposto em camadas, subdivididas em duas regiões principais: a região mais superficial, composta por três camadas relacionadas essencialmente ao processamento da informação visual, o *stratum zonale* (SZ), o *stratum griseum superficiale* (SGS) e *stratum opticum* (SO) (FIGURA 2). O SZ é a menor camada superficial, apresentando o menor número de neurônios. O SGS é a principal camada pós-sináptica, onde se encontram os neurônios-alvo para os aferentes retinianos. O SO é a camada mais ventral dentre as camadas visuais, e é por ela que os axônios da retina trafegam antes de alcançar o SGS (Binns, 1999; Hilbig *et al.*, 2000).

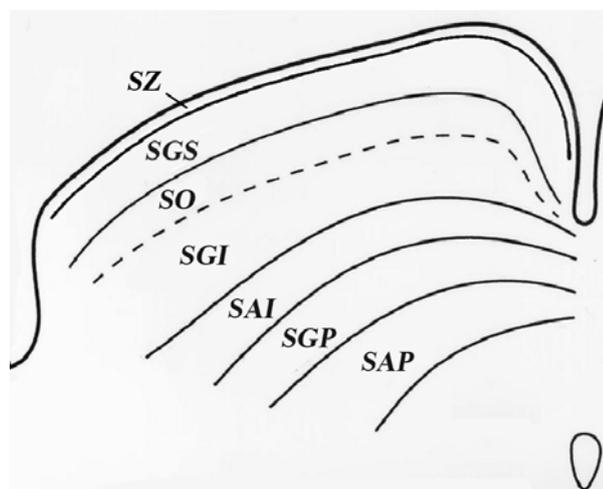


FIGURA 2: Representação da estrutura laminar do colículo superior. As camadas superficiais, *stratum zonale* (SZ), *stratum griseum superficiale* (SGS) e *stratum opticum* (SO) e a região mais profunda, de integração de informações somatossensoriais e auditivas, que são *stratum griseum intermediale* (SGI), *stratum album intermediale* (SAI), *stratum griseum profundum* (SGP) e *stratum album profundum* (SAP) (Binns, 1999; Isa & Saito, 2001). Adaptado de (Parsons *et al.*, 2001).

Apesar das camadas superficiais e profundas serem descritas como estruturas independentes por integrarem informações distintas, estudos já demonstraram a ocorrência de transmissão visual das áreas mais superficiais para a região mais profunda, demonstrando assim a existência de mecanismos de correlação interlaminares no CS (Mooney *et al.*, 1992).

1.3 O mapa retinotópico

A maneira precisa com a qual o sistema nervoso funciona requer uma apropriada interação entre aferências pré-sinápticas e seus alvos pós-sinápticos. Uma das características dos padrões de conectividade axonal dos sistemas sensoriais é sua organização em mapas topográficos. Com o padrão de organização do sistema visual já estabelecido, os axônios retinotectais apresentam uma topografia organizada, em que a inervação de seus alvos reflete a organização das células da retina, ou seja, axônios de células ganglionares adjacentes na retina ocuparão regiões vizinhas na superfície do colículo superior (CS) (Garel & Rubenstein, 2004).

Os axônios das CGR da região temporal da retina se projetam para a região mais rostral do CS, enquanto que a região nasal da retina inerva a área mais caudal do colículo (FIGURA 3). Dessa forma, a representação da retina no colículo superior é caracterizada de forma que o eixo naso-temporal da retina que projeta para o eixo ântero-posterior do CS e o eixo dorso-ventral da retina projeta para a região latero-medial do CS (FIGURA 4) (Knoll & Drescher, 2002; McLaughlin & O'Leary, 2005; Schulte & Bumsted-O'Brien, 2008).

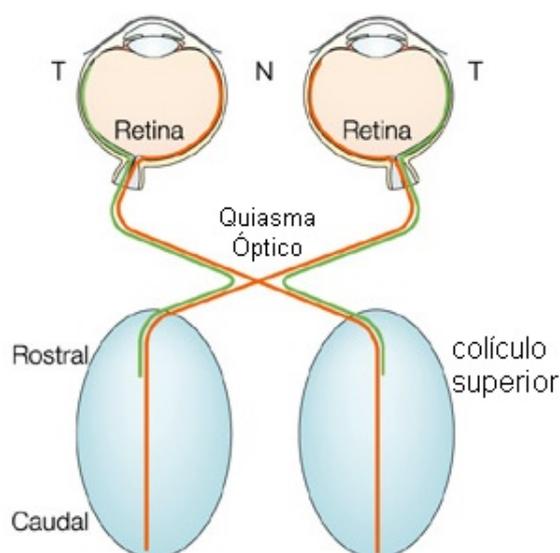


FIGURA 3: Representação do sistema visual de mamíferos. As projeções das células ganglionares da retina (CGR) sofrem decussação parcial no quiasma óptico, de tal forma que as células da retina temporal que não cruzam se estabilizam na região rostral do colículo superior (CS) ipsilateral (verde), enquanto que as células da retina temporal cruzam quiasma óptico e se projetam para a região caudal do CS contralateral (vermelho). Adaptado de Kun-Liang Guan & Yi Rao, 2003. (Guan & Rao, 2003)

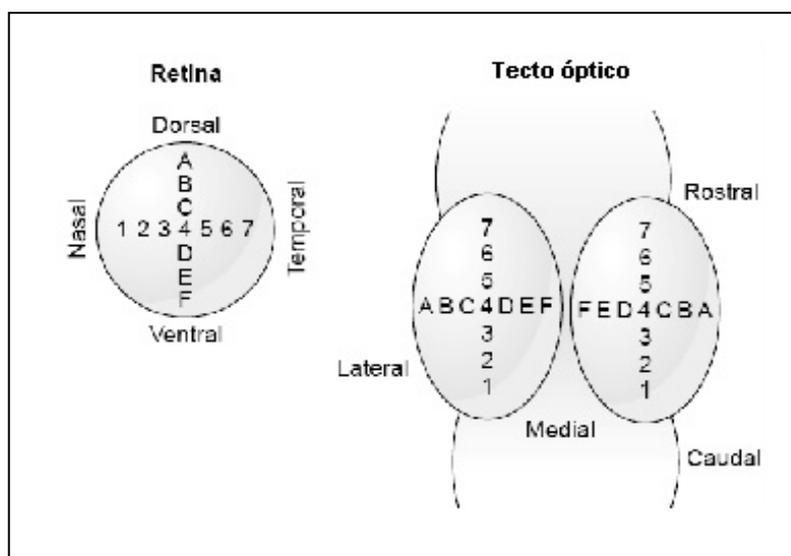


FIGURA 4: Esquema representativo da topografia retinotectal. As projeções das células ganglionares da retina (CGR) se distribuem de forma organizada de modo que as CGR nasal se projetam a para a região caudal do tecto óptico, as projeções das CGR temporais se projetam para a região rostral, as CGR dorsais se projetam para o tecto lateral e as CGR ventrais para a região medial do tecto. (Debsky e Cline, 2002)

1.4 O desenvolvimento das projeções retinotectais

O desenvolvimento da topografia retinotectal de roedores envolve uma seqüência de eventos. As células ganglionares da retina (CGR) de ratos são geradas entre os dias embrionários 14 e 22 (E14 – E22) (Reese & Colello, 1992). Estudos mostram que em E15 são observados os primeiros cones de crescimento no quiasma óptico (Horsburgh & Sefton, 1986). Em E16, as projeções já alcançam a borda anterior do colículo superior (CS) e em torno de E17 já são detectadas as primeiras sinapses. (Lund & Lund, 1976). Ao nascimento, o CS é considerado uma estrutura ainda imatura, contendo pequenos corpos celulares uniformes e agrupados em regiões superficiais (Warton & Jones, 1985).

Apesar dos axônios das CGR atingirem as áreas visuais cerebrais em estágios iniciais do desenvolvimento essas projeções encontram-se desordenadas. Em um primeiro momento, arborizações exuberantes são grosseiramente distribuídos pela superfície do CS. Nessa etapa, os axônios ipsolaterais da retina arborizam-se de maneira desordenada ao longo dos eixos rostro-caudal e médio-lateral do CS. Por volta da segunda semana pós-natal, as projeções retinotectais de roedores apresentam um desenvolvimento similar ao de animais adultos. (Lund & Lund, 1976; Serfaty & Linden, 1994). Eventos regressivos como a morte neuronal natural de CGR e a eliminação de sinapses transitórias irão permitir a restrição topográfica dos terminais axonais ipsolaterais e contralaterais. Ao fim da segunda semana pós-natal, os axônios referentes ao olho ipsolateral, que correspondem a 5% das aferências no CS, convergem em pequenos aglomerados no limite ventral do SGS e limite dorsal do SO, no terço anterior do colículo

(Serfaty & Linden, 1994) (FIGURA 5). Já as projeções do olho contralateral, que correspondem a 95% das fibras, acabam por se sobrepor as projeções ipsolaterais, ocupando toda a extensão das camadas visuais (Lund *et al.*, 1980; Hofbauer & Drager, 1985).

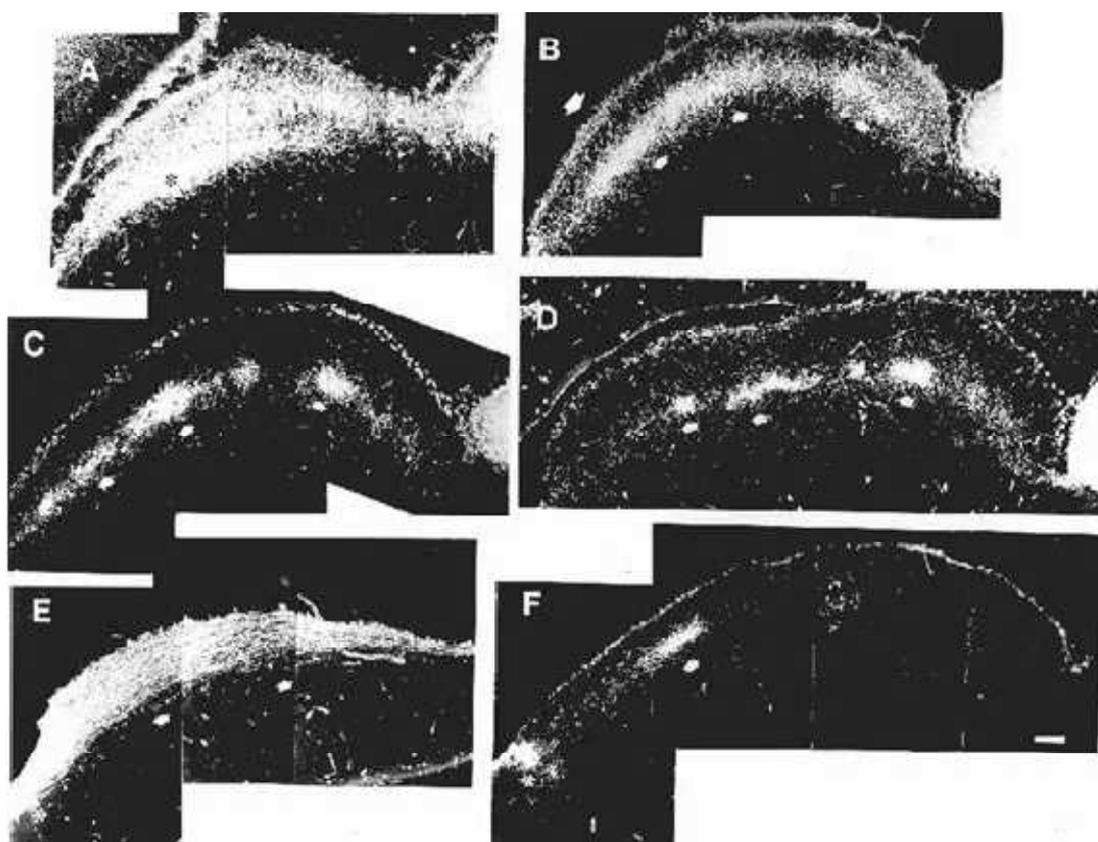


FIGURA 5: Fotomicrografias de campo escuro do colículo superior (CS) de ratos em cortes coronais (A-D) ou parassagitais (E-F) demonstrando a formação da topografia retinotectal através da progressiva restrição das projeções ipsolaterais no terço anterior do CS. Animais receberam injeções intraoculares de peroxidase no dia pós-natal 0 (DPN0), período de intensa marcação de projeções pelo CS (A e E); DPN3 (B); DPN5 (C e F); e DPN10 (D), período em que já é observado a formação de aglomerados de marcação terminal na região ventral do CS. (Serfaty e Linden, 1994).

1.5 Mecanismos independentes de atividade elétrica

Durante as etapas de eliminação de axônios transitórios e a formação de uma topografia rudimentar, os cones de crescimento presentes na extremidade dos axônios das células ganglionares da retina (CGR) interagem com moléculas que atuam como pistas químicas, influenciando na velocidade e direção do crescimento axonal aos seus alvos adequados. (Holt & Harris, 1993). A família dos receptores Eph e das efrinas são as moléculas descritas mais completas que remetem o seu papel como moléculas de direcionamento axonal, sendo estas relacionadas com mecanismos repulsivos/atrativos de orientação dos axônios. (Flanagan & Vanderhaeghen, 1998; Mellitzer *et al.*, 2000; Knoll & Drescher, 2002; McLaughlin & O'Leary, 2005).

Estudos demonstraram que a disposição dessas moléculas em gradientes complementares influencia o estabelecimento de mapas topográficos no sistema retinotectal, pois os aferentes das CGR se distribuem primordialmente em função do gradiente de concentração dessas moléculas (Drescher *et al.*, 1997; Lemke & Reber, 2005; McLaughlin & O'Leary, 2005) (FIGURA 6). No CS, as efrinas são expressas num gradiente de posterior para anterior, suprimindo a formação de terminais de axônios originados da retina temporal, que expressam receptores Eph na região posterior desta estrutura (Goodhill & Richards, 1999; Mellitzer *et al.*, 2000; Yates *et al.*, 2001; Schulte & Bumsted-O'Brien, 2008).

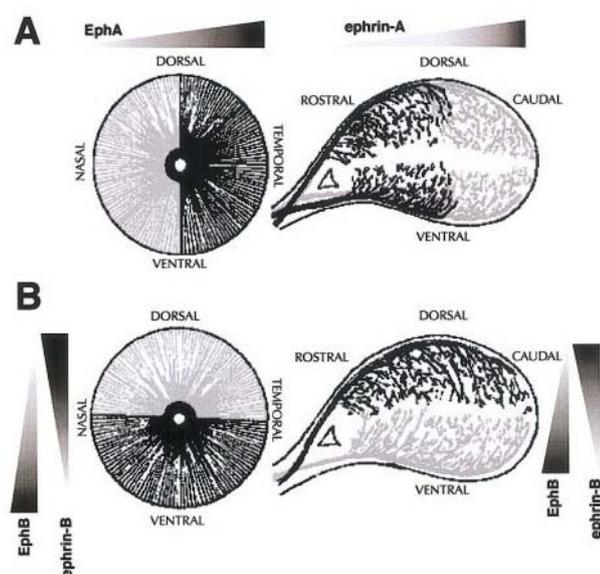


FIGURA 6: Figura esquemática do direcionamento axonal mediado por gradientes complementares de concentração das efrinas no colículo superior e de seus receptores (Ephs) na retina. Em (A) notar a maior quantidade de efrinas-A no colículo superior (CS) caudal e de receptores EphA presentes na retina temporal, causando a repulsão das projeções das CGR e conseqüente estabilização na região rostral do CS. Em (B) a representação do eixo dorso-ventral. O gradientes complementares de efrinas-B e de seus receptores EphB na retina e no CS denotam que CGR provenientes da retina ventral se estabilizam na região dorsal do CS. (RUTHAZER E CLINE, 2004)

Outras moléculas, também presentes em superfícies celulares, como a moléculas de direcionamento repulsivo e as semaforinas, também apresentam importância no direcionamento axonal (Goodhill & Richards, 1999; McLaughlin & O'Leary, 2005). Além disso, proteínas da matriz extracelular interagem com receptores da superfície celular, regulando eventos cruciais em diversos estágios do desenvolvimento do SNC, como crescimento de neuritos, orientação do cone de crescimento e estabilização sináptica (Dityatev & Schachner, 2003). A expressão de proteínas como a laminina está diretamente relacionada ao período de maturação da topografia retinotectal, estando envolvida nos processos de sinaptogênese e estabilização sináptica no colículo superior (Oliveira-Silva, 2003). Oliveira-Silva (2007) demonstrou que o bloqueio da atividade da

metaloproteinase-9 (MMP-9) inibe a formação de aglomerados de marcação, promovendo assim, a ruptura do mapa retinotópico durante o período crítico do desenvolvimento de roedores. Os dados indicam que a MMP-9 tem papel fundamental na estabilização das conexões retinotectais durante o período crítico (Oliveira-Silva *et al.*, 2007).

1.6 Mecanismos dependentes de atividade elétrica

Após as projeções das células ganglionares da retina (CGR) alcançarem a superfície do colículo superior (CS), com a subsequente formação de uma topografia rudimentar dependente da interação com moléculas atrativas e repulsivas, essas conexões serão submetidas a um processo de refinamento, onde o sistema alcança uma sintonia fina. A topografia precisa das projeções retinofugais se desenvolve em decorrência da reorganização uso-dependente das árvores axonais, cujas ramificações exuberantes são eliminadas enquanto ramificações que compartilham aspectos temporais de ativação com axônios vizinhos, e que portanto, são mais aptos em ativar os terminais pós-sinápticos são mantidos em um processo reminescente da sinapse Hebianna (Meyer, 1998; Goodhill & Richards, 1999; Mrsic-Flogel *et al.*, 2005). A atividade elétrica é, portanto, requerida para o estabelecimento e a manutenção das conexões no sistema retinotectal em desenvolvimento (Cline & Constantine-Paton, 1990).

Em mamíferos, ondas de atividade elétrica espontânea surgem antes mesmo do nascimento e antecedem a experiência visual que ocorre após a abertura dos olhos (Holt & Harris, 1993; Wong *et al.*, 1993; Ruthazer & Cline,

2004). A atividade espontânea parece ser necessária para o rearranjo das projeções da retina no núcleo geniculado lateral (NGL), já que o bloqueio da atividade com tetrodotoxina (TTX), uma toxina que se liga com alta afinidade a canais de sódio voltagem-dependentes, impede a segregação das CGR em camadas olho-específicas (Shatz & Stryker, 1988; Wong *et al.*, 1993).

Um estudo de Chandrasekaran (2005) demonstrou que a ausência de atividade espontânea rompe o padrão de refinamento das conexões e manutenção da topografia no CS de roedores. Somente entre DPN12-13 são detectadas respostas evocadas no CS destes animais, período este que coincide com a abertura dos olhos (Molotchnikoff & Itaya, 1993). Não somente a atividade neural parece ser importante, como também o padrão temporal de disparo são críticos para determinar quais conexões serão retidas e fortalecidas e quais serão enfraquecidas e eliminadas (Maffei & Galli-Resta, 1990; Meister *et al.*, 1991; Shatz, 1996; Shah & Crair, 2008).

A idéia de que a atividade sincronizada é necessária para a formação de mapas topográficos advém da observação de padrões intimamente correlacionados de CGR (Butts, 2002; Debski & Cline, 2002; Mrsic-Flogel *et al.*, 2005). Células ganglionares adjacentes que disparam na mesma frequência temporal, ao ativarem células pós-sinápticas, promovem a somação de potenciais pós-sinápticos excitatórios (PPSEs), aumentando a eficiência da transmissão sináptica (Constantine-Paton *et al.*, 1990; Shatz, 1996; Cooper, 2005; Sjostrom *et al.*, 2008)

1.6.1 Papel de Receptores para Glutamato

Os processos pelos quais a atividade elétrica induz o desenvolvimento de topografia fina no sistema retinotectal estão relacionados a ativação de receptores pós-sinápticos envolvidos na neurotransmissão excitatória. Dentre estes, o receptor para o N-metil-D-aspartato (NMDA) tem sido apontado como importante, visto que as projeções retinianas que chegam ao CS são predominantemente glutamatérgicas (Constantine-Paton *et al.*, 1990; Lu & Constantine-Paton, 2004). Os receptores NMDA são canais iônicos que permitem a condutância de cálcio somente quando ativados por ligante, o neurotransmissor glutamato, e quando a membrana pós-sináptica é suficientemente despolarizada por estímulos excitatórios que perpassam pelo receptor AMPA/Kainato (Debski *et al.*, 1990; Feller, 2002). A atividade do receptor NMDA é requerida para determinar a interação e estabilização das aferências retinianas com o seu alvo apropriado (Cline & Constantine-Paton, 1990). Sendo assim, o receptor NMDA (NMDAR) é responsável pelo ordenamento topográfico das fibras retinianas, considerado um detector de coincidências (Debski & Cline, 2002; Ruthazer & Cline, 2004). O NMDAR tem papel chave na indução de formas específicas de plasticidade sináptica (Barry & Ziff, 2002).

A composição das subunidades dos receptores NMDA é regulada durante o desenvolvimento, sendo a subunidade NR2 determinante das propriedades biofísicas e farmacológicas. Inicialmente, são compostos primordialmente pelas subunidades NR2B, enquanto os receptores contendo a subunidade NR2A são observados em fases mais tardias (Townsend *et al.*, 2004). A composição dos

NMDAR presentes na membrana pode influenciar eventos de sinalização intracelular, a inserção de novos receptores, além de ser importante para os processos de estabilização da topografia retinotectal, por contribuir com a diminuição da plasticidade do sistema (Lau & Zukin, 2007). Trabalhos demonstraram que o bloqueio do receptor com antagonistas específicos, como o APV, produz perturbações na estabilidade das projeções retinotectais, rompendo o padrão da topografia (Cline & Constantine-Paton, 1990; Schmidt, 1990).

Outras evidências mostram que em sinapses imaturas no sistema nervoso central, a transmissão glutamatérgica é inicialmente composta por receptores NMDA, nas chamadas sinapses silenciosas. Sinapses mais maduras adquirem sua capacidade de transmissão sináptica durante, através da inserção na membrana de receptores AMPA (Liu & Chen, 2008; Shah & Crair, 2008).

Os receptores AMPA (AMPA) são tetrâmeros compostos de 4 subunidades (GluR1-4). Receptores contendo a subunidade GluR1 são inseridos na membrana por mecanismos dependentes de atividade elétrica, em sinapses onde previamente não eram observados AMPAR. Em fases iniciais do desenvolvimento, há um predomínio de subunidades GluR1 na membrana, em relação à subunidade GluR2. Já os receptores que apresentam a subunidade GluR2 são constitutivos e são inseridos na membrana por eventos cíclicos, apresentando alta mobilidade de entrada e saída do sítio sináptico, sendo esse mecanismo independente de atividade (Barry & Ziff, 2002). Pelo fato dos receptores AMPA medirem PPSEs, alterações na atividade e no número de receptores inseridos na membrana podem interferir no fortalecimento de sinapses (Sheng & Kim, 2002).

1.7 Período crítico e plasticidade no sistema nervoso

Os processos que interferem na maturação dos sistemas sensoriais envolvem o fortalecimento de circuitos neurais e a correção de erros que são gerados durante a formação dos contatos sinápticos. Essa capacidade plástica de organização promove alterações funcionais nos sistemas e depende dos padrões de atividade neural. (Constantine-Paton, 2000; Ruthazer & Cline, 2004; Chandrasekaran *et al.*, 2005; Mrsic-Flogel *et al.*, 2005).

Durante o desenvolvimento, o rearranjo das conexões pode ser alterado, não só por modificações no microambiente celular, mas principalmente pela influência do meio ambiente. Esta fase ocorre durante uma janela temporal denominada **período crítico**, quando os circuitos são particularmente susceptíveis a estímulos do ambiente, regulados de acordo com a experiência sensorial. (Katz & Crowley, 2002; Spolidoro *et al.*, 2009). Nessa fase, os processos de formação e estabilização das sinapses são altamente dinâmicos e envolvem alterações anatômicas, fisiológicas e neuroquímicas, sensíveis a estímulos oriundos do meio ambiente (Morgane *et al.*, 1993). Estes períodos são típicos de cada espécie, sendo que na espécie humana não existem dados claros na literatura que delimitem com segurança os períodos críticos cognitivos (TABELA 1). Estima-se que grande parte destes processos se estenda, em humanos, até os 5-12 anos de vida. A experiência é um forte determinante para a duração de períodos críticos. A total ausência de experiência geralmente prolonga o período crítico e atrasa o desenvolvimento das funções sensoriais (Berardi *et al.*, 2000). Essa capacidade

plástica de responder estímulos internos e externos vai diminuindo ao longo da vida, mas não se extinguem na vida adulta (Spolidoro *et al.*, 2009).

TABELA 1: Períodos Críticos de Desenvolvimento do SNC

Espécie	Período Crítico	Referência
Roedores	2-3 semanas após o nascimento	Land & Lund, 1980 Serfaty & Linden, 1994
Felinos	3 ^a à 9 ^a semana pós-natal	(Cynader <i>et al.</i> , 1990)
Primatas	12 meses pós-natal	(Hubel & Wiesel, 1962)
Homem	5-12 anos pós-natal	Berardi et al, 2000

O período crítico foi amplamente estudado em modelos experimentais que utilizaram o sistema visual de mamíferos. Essa idéia é originada de estudos sobre a arquitetura funcional do córtex visual de mamíferos, especialmente na formação de colunas de dominância ocular (Cohen-Cory, 2002; Katz & Crowley, 2002) (FIGURA 7).

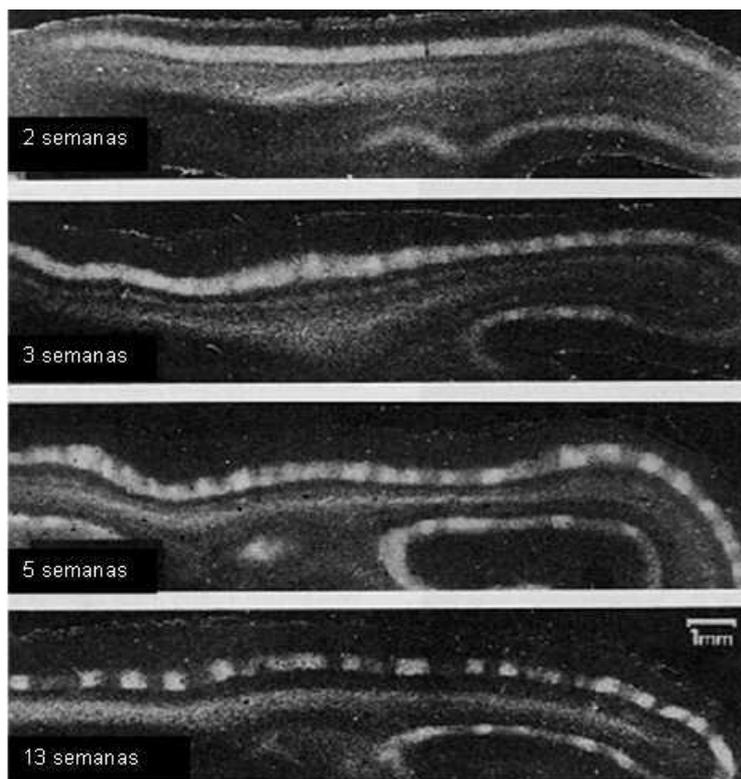


FIGURA 7: Formação das colunas de dominância ocular em gatos nas primeiras treze semanas após o nascimento, com a segregação da inervação em regiões olho-específica, demonstrado pela alternância de marcação entre os olhos direito (campos claros) e esquerdo (campos escuros). Observar a ordenação topográfica ao longo do desenvolvimento, primeiramente na segunda semana pós-natal (topo) com a marcação em forma de uma linha contínua (padrão imaturo), até a observação do padrão adulto na 13^a semana pós-natal. (Shatz & Stryker, 1978). (Shatz & Stryker, 1978)

O refinamento do sistema retinotectal tem sido demonstrado em roedores em um período espacial de desenvolvimento de 3 semanas, momento em que ocorre o aumento no fortalecimento das sinapses (Hensch, 2004; Liu & Chen, 2008).

Da mesma forma que no desenvolvimento normal, respostas plásticas podem ser obtidas após lesões no sistema nervoso. A magnitude e o curso temporal destas respostas variam de tal forma que lesões ocorridas em fases iniciais do desenvolvimento induzem respostas plásticas mais rápidas e robustas do que em fases mais tardias. Assim, dentro do período crítico, os axônios visuais apresentam uma grande capacidade de reorganização em resposta a lesões, para

então se adaptar às variadas condições do meio ambiente. Estudos utilizando modelos de lesão no SNC permitem observar a viabilidade ou não de se restabelecer as conexões (Lund *et al.*, 1980; Constantine-Paton *et al.*, 1990; Heiduschka & Thanos, 2000; Debski & Cline, 2002).

Trabalhos do nosso laboratório já demonstraram que lesões em setores restritos da retina temporal geram denervação localizada em uma área correspondente no colículo superior contralateral (FIGURA 8B). As projeções ipsilaterais do olho intacto sofrem uma reorganização, caracterizada pela presença de inervação anômala na superfície do CS (FIGURA 8A E 8C) (Serfaty *et al.*, 2005).

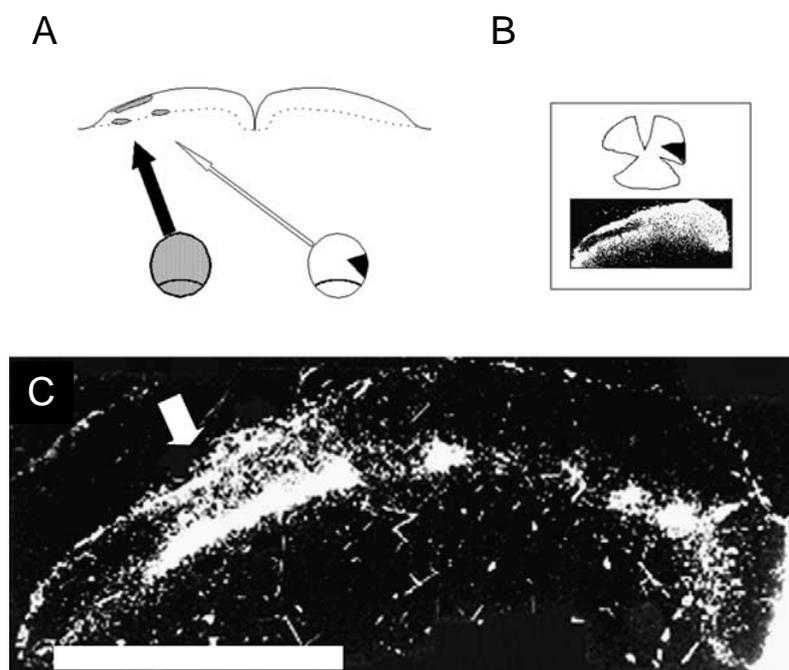


FIGURA 8: (A) Esquema representativo dos efeitos observados através da lesão de retina temporal. (B) Injeção intraocular de peroxidase revela a denervação no CS ocasionada pelo efeito da lesão de retina temporal. (C) Fotomicrografia de campo escuro de cortes coronais de CS de ratos submetidos a lesão de retina em DPN10, mantidos em sobrevivência por 48 horas. A seta indica a reorganização das projeções ipsilaterais frente à lesão, com um padrão bilaminar de marcação dos terminais axonais na superfície subpial do CS. Adaptado de Serfaty, 2005.

1.8 Papel dos mensageiros retrógrados

Os diversos mecanismos relacionados com o fortalecimento de sinapses e eventos de plasticidade dependem do acoplamento sináptico preciso entre as células neuronais, em que sinais elétricos pré-sinápticos desencadeiam respostas pós-sinápticas pela liberação de neurotransmissores. Entretanto, estudos já demonstraram que a transmissão das informações não é um evento unidirecional. Uma variedade de sinais de retroalimentação são transmitidos de maneira retrógrada da célula pós-sináptica para o neurônio pré-sináptico, modulando a liberação de neurotransmissores e a eficácia sináptica nos terminais axonais (Alger, 2002; Micheva *et al.*, 2003). O refinamento das conexões sinápticas no sistema visual parece depender de mensageiros retrógrados, que modulam a atividade elétrica, de modo a estabilizar sinapses durante o desenvolvimento (Mize & Lo, 2000; Zilberter *et al.*, 2005).

Os mensageiros retrógrados estão envolvidos em diversas funções, incluindo a formação e a manutenção dos circuitos neurais, bem como fenômenos de plasticidade sináptica. (Micheva *et al.*, 2003). Gases como o óxido nítrico (NO) e o monóxido de carbono, assim como lipídios como o ácido araquidônico (AA) e o fator de ativação plaquetária (PAF), foram os primeiros mensageiros retrógrados descritos no hipocampo (Bazan *et al.*, 1997; Alger, 2002). Tanto o NO quanto o AA e seus metabólitos já foram relacionados participando da regulação da potenciação de longa duração (LTP), facilitando a liberação pré-sináptica de glutamato, aumentando assim a eficiência sináptica (Chalimoniuk *et al.*, 2006).

O NO e do AA exercem papéis complementares na formação do mapa retinotópico. A atividade retrógrada de NO é observada em fases iniciais do desenvolvimento de roedores, visto que o bloqueio farmacológico da enzima óxido nítrico sintase (NOS) produziu rearranjos nas projeções ipsolaterais retinotectais ainda dentro do período crítico, sendo que este efeito não foi observado em após a terceira semana pós-natal. Já o AA promove alterações em idades mais tardias, estando, portanto, relacionado em mecanismos de manutenção das conexões (Campello-Costa *et al.*, 2000; Campello-Costa *et al.*, 2006).

1.9 Aspectos nutricionais no desenvolvimento do sistema nervoso

A literatura atual possui resultados consistentes que indicam que tanto a parte química, quanto funcional do desenvolvimento e maturação do cérebro pode ser influenciada pela dieta (Wainwright, 2002).

Os fatores nutricionais interferem diretamente nos parâmetros macro e microscópicos do desenvolvimento neural, tais como crescimento encefálico, incluindo parâmetros morfométricos de espessura cortical, alterações na morfologia de dendritos, número de sinapses e quantidade de células de glia (Ballabriga, 1990). Estes fatores são de grande importância durante o desenvolvimento do sistema nervoso central, notadamente em função da existência de períodos críticos para a formação e diferenciação de circuitos neurais, pois seus efeitos abrangem duas fases limitantes na formação neural, que são a vida embrionária e o período neonatal (Morgane *et al.*, 1993).

Nutrientes ditos essenciais são aqueles adquiridos exclusivamente através da ingestão e, portanto, fatores sócio-culturais envolvidos em carências

nutricionais podem levar a alterações funcionais de vias neuroquímicas, com conseqüências para a formação de circuitos neurais. Dentre os nutrientes, os primeiros a serem reconhecidos como fundamentais para o funcionamento orgânico foram as proteínas (Ballabriga, 1990). Ao se avaliar parâmetros microscópicos, os efeitos da carência de proteínas incluem desde diminuição do número de células nervosas, até atrasos nos processos de diferenciação celular, sinaptogênese e deficiência de mielinização (Morgane *et al.*, 1993).

Depois do tecido adiposo, o sistema nervoso possui a maior concentração lipídica do organismo. Estes lipídios, altamente sensíveis a alterações dietéticas, participam da formação e fisiologia da membrana celular e são capazes de afetar a atividade de enzimas e receptores de membrana (Blass & Gibson, 1999).

Cada vez mais tem sido evidenciada a importância da inclusão dietética, principalmente em períodos precoces do desenvolvimento, de ácidos graxos que não podem ser sintetizados pelo organismo, os denominados essenciais - α -linolênico (ω -3) e linoléico (ω -6) (Fernstrom, 2000; Farkas *et al.*, 2002).

1.10 Ácidos graxos essenciais

Ácidos graxos são ácidos carboxílicos alifáticos obtidos da hidrólise das gorduras e óleos naturais. São geralmente formados por cadeias de hidrocarbonetos com um número par de átomos de carbonos, que variam de 4 a 26 átomos. Além das diferenças de comprimento da cadeia, os ácidos graxos variam quanto ao número e arranjo das duplas ligações ao longo da cadeia de hidrocarbonetos (FIGURA 9) (Ettinger, 2002; Mayes *et al.*, 1994). Com relação às

duplas ligações, os ácidos graxos podem ser saturados, monoinsaturados (AGMI) e poliinsaturados (AGPI). AGPI cadeia muito longa (20-22 átomos de carbono) predominam no cérebro e nos tecidos especializados, como a retina e os espermatozóides. (Uauy & Castillo, 2003).

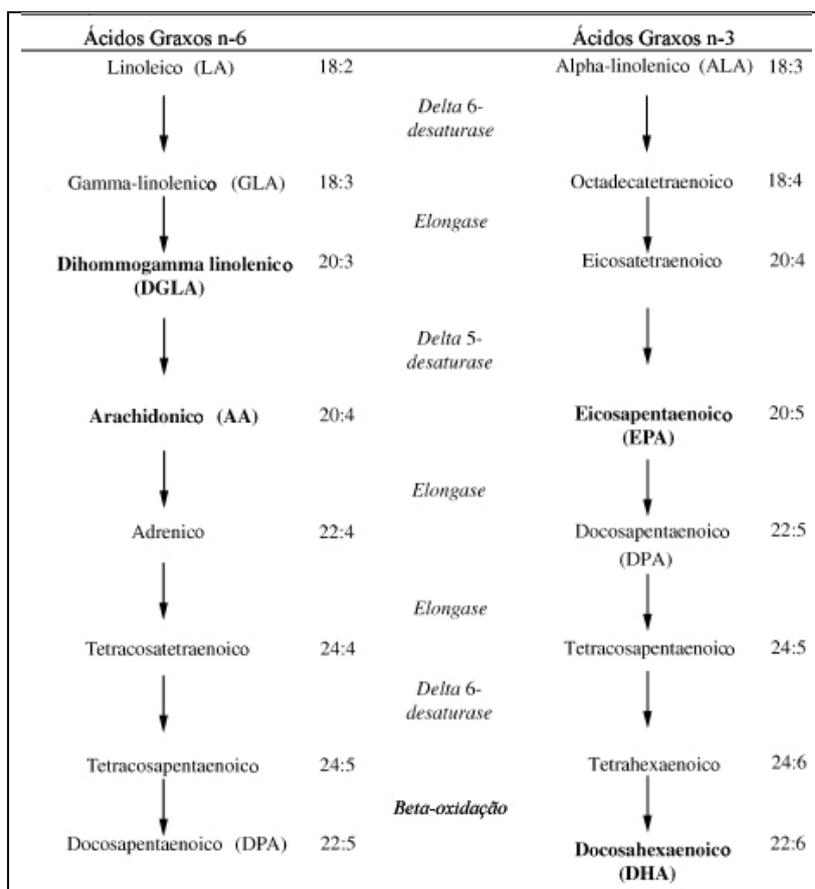


FIGURA 9: Mecanismos de alongação de dessaturação dos ácidos graxos das famílias n-3 e n-6. Os AGE precursores, ácido linoléico e ácido α -linolênico competem pelas dessaturases e elongases de modo a promover a formação de seus derivados lipídicos. Destaque para o ácido araquidônico (AA), da família n-6 e para os ácidos eicosapentanóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), da família n-3. (Adaptado de: Richardson, 2000)

Em 1918, Aron foi o primeiro a propor que as gorduras poderiam ser essenciais para o crescimento e desenvolvimento normais em animais. Posteriormente, Evans e Burr (1927) demonstraram que a deficiência de gorduras afetava gravemente o crescimento e a reprodução de animais experimentais. O trabalho de Burr e Burr (1929) mostrou pela primeira vez a importância nutricional de lipídios específicos. Ratos recém-desmamados, alimentados com uma dieta ausente em gorduras, apresentaram prejuízo no crescimento, pele escamosa, necrose da cauda e aumento da mortalidade (Jones, 2003). Com o passar das décadas, trabalhos realizados em animais e pesquisas desenvolvidas com humanos afirmam a natureza essencial dos ácidos graxos das famílias n-3 e n-6 nos estágios primários da vida. Os efeitos mais significativos estão relacionados com desenvolvimento neural e maturação dos sistemas sensoriais (Uauy *et al.*, 2000).

Os lipídios correspondem cerca de 50-60% do peso seco do cérebro de um indivíduo adulto, sendo desta quantidade, 35% aproximadamente estão na forma de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) de cadeia longa. Dentre estes, o ácido araquidônico (AA) e o ácido decosahexanóico (DHA) são encontrados em maior quantidade. Esses ácidos são derivados da biossíntese de seus precursores que são, respectivamente, o ácido linoléico e ácido α -linolênico (Wainwright, 2002).

Durante a formação dos novos ácidos graxos, as enzimas biossintéticas dos mamíferos podem inserir duplas ligações na posição n-9 ou superior. Entretanto, estas enzimas não podem inserir duplas ligações em nenhuma posição mais próxima ao grupo metila terminal. Por esta razão, ácidos graxos com duplas ligações nas posições n-6 e n-3 são como classes individuais, considerados

essenciais (FIGURA 10). Estes ácidos graxos essenciais (AGEs) devem, portanto, ser obtidos de vegetais e de outros organismos que possuam as vias enzimáticas para sua construção (Heird & Lapillonne, 2005).

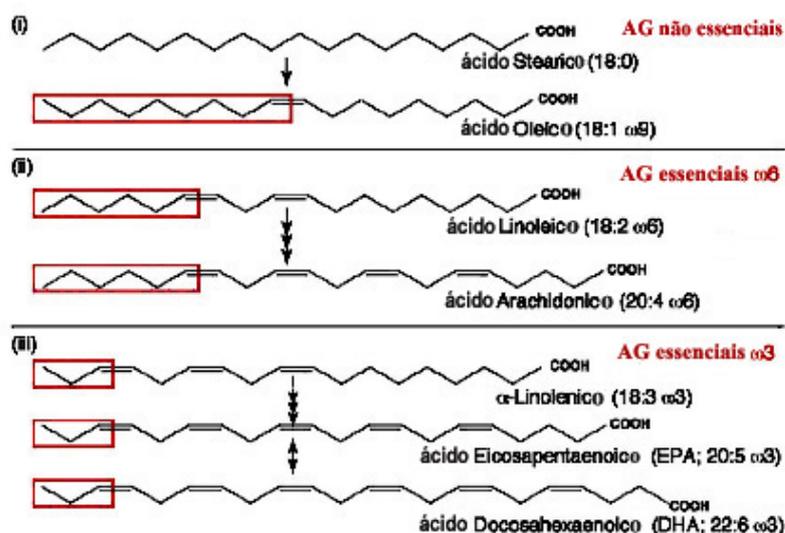


FIGURA 10: Essencialidade dos ácidos graxos essenciais. A inserção de duplas ligações apenas a partir da posição nove da cadeia de hidrocarbonetos impede a conversão endógena do ácido linoléico e do ácido α -linolênico, sendo, portanto considerados essenciais e obtidos exclusivamente através da dieta. (Smith, 2008)

Durante o último trimestre intrauterino e os primeiros 18 meses da vida pós-natal humana, DHA e AA são acumulados rapidamente no sistema nervoso central. É neste período que ocorre a explosão do crescimento cerebral (Carlson, 2001; Dijk-Brouwer *et al.*, 2005).

Durante o primeiro ano de vida, o AA e o DHA são fornecidos via leite materno para a criança. Esses AGEs são avidamente incorporados pelas membranas presentes no sistema nervoso. A utilização na dieta de óleos vegetais permite um consumo adequado de AGEs, já que esses alimentos são considerados grandes fontes de AG ω -6. Alimentos ricos em AA são a gema do ovo, órgãos e

músculos de animais. Vegetais folhosos e algumas frutas também contribuem para o consumo de ácido linolênico (ω -3). Peixes frescos e óleos de peixe processados são considerados as maiores fontes de ácido eicosapentaenóico (EPA) e DHA (Youdim *et al.*, 2000; Broadhurst *et al.*, 2002; Singh, 2005; Koletzko *et al.*, 2008).

Os suprimentos adequados de AGEs são requeridos durante o desenvolvimento e na vida adulta, como o objetivo de manter a função cerebral normal. Vários fatores podem interferir na conversão dos ácidos precursores em seus produtos. Esses fatores incluem: consumo de ácidos graxos saturados e hidrogenados; deficiência de vitaminas e minerais, que atuam como co-fatores (principalmente deficiência de zinco); consumo excessivo de álcool; hormônios relacionados ao stress. Esses potenciais bloqueadores indicam que mesmo com a ingestão adequada de AGEs na dieta, a deficiência de AA e DHA pode ocorrer na presença desses fatores. Além disso, diferenças constitucionais no metabolismo de AGEs estão sendo cada vez mais reconhecidas como possíveis fatores de risco de desordens relacionadas ao neurodesenvolvimento (Richardson & Puri, 2000).

Em neurônios, células gliais, e células endoteliais dos vasos sanguíneos cerebrais, alguns *pools* de fosfolipídios vêm sendo reconhecidos como reservatórios de mensageiros lipídicos. Mensageiros lipídicos específicos são clivados destes reservatórios através de estimulação por neurotransmissores; fatores neurotróficos; citocinas; despolarização de membrana; e ativação de canais de íons. Mensageiros lipídicos regulam e interagem com múltiplas cascatas de sinalização, contribuindo para o desenvolvimento, diferenciação, função sináptica, proteção, e reparo de células no sistema nervoso (Bazan, 2003).

Estas ações são iniciadas pelas fosfolipases. A fosfolipase A₂ (PLA₂), por exemplo, pode liberar ácido araquidônico (AA), ácido dihomo-gamalinolênico (DGLA) e ácido eicosapentanóico (EPA) clivando, geralmente esses AGPI presentes na posição 2 da membrana (Haag, 2003). Esses ácidos graxos livres, decorrentes da ação desta enzima, são então liberados no meio extracelular para agir em outras células (Marszalek & Lodish, 2005).

Além disso, os AGEs podem ser convertidos em potentes moléculas de sinalização autócrinas e parácrinas pela ação das ciclooxigenases (COXs), lipoxigenases (LOXs), e monooxigenases do citocromo P450. A formação desses derivados lipídios bioativos pode influenciar as funções neurais através da ativação de fontes de eicosanóides, um grupo de compostos oxigenados de 20 carbonos, que incluem prostaglandinas (PGs), tromboxanos e leucotrienos (FIGURA 11). Apesar do ácido araquidônico (AA) ser o maior precursor desses eicosanóides, eles também podem ser derivados do ácido graxo dihomo-gama-linolênico (20:3n-6), ou ácido graxo eicosapentanóico (20:5n-3), referidos então como as séries 1 (AA), 2 (ácido dihomo-gama-linolênico) e 3 (ácido eicosapentanóico) (Wainwright, 2002). O AA e o EPA competem como substratos para a ciclooxigenase (COX) e a lipoxigenase (LOX) enzimas que participam da cascata de produção dos eicosanóides (Heird & Lapillonne, 2005).

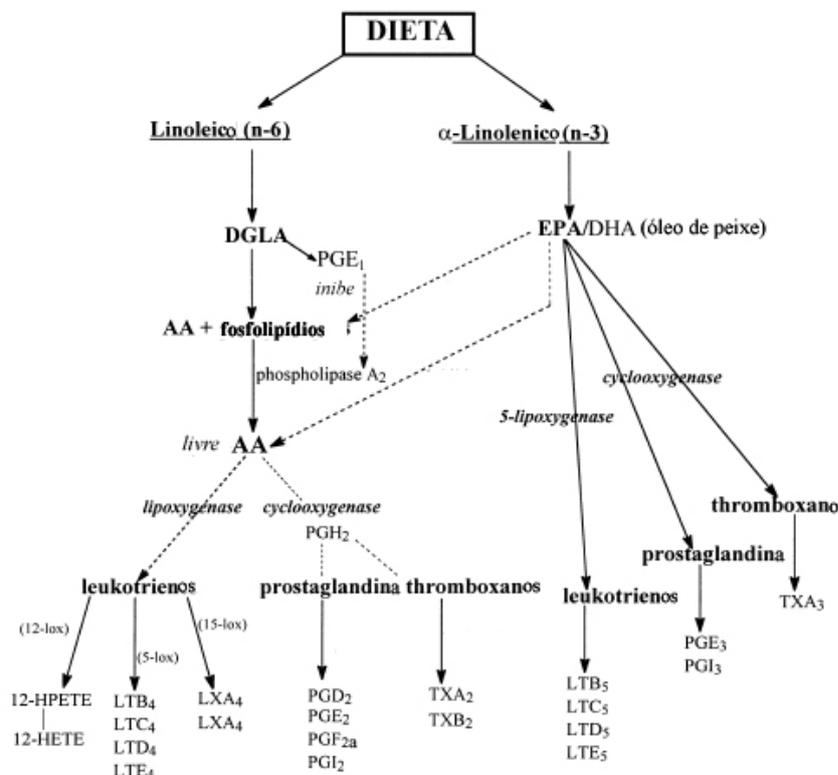


FIGURA 11: Ácidos graxos essenciais como precursores da síntese de eicosanóides. Através da atividade das enzimas ciclooxigenases e lipoxigenases, AA, DGLA, EPA e DHA podem ser convertidos em eicosanóides (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos), que apresentam papéis importantes no controle imunológico em eventos inflamatórios, e como lipídios bioativos no sistema nervoso (Youdim, 2000). Abreviaturas: ácido dihomogamalinoleico (DGLA); ácido araquidônico (AA); ácido eicosapentanóico (EPA); ácido docasahexaenóico (DHA); prostaglandinas (PGs); leucotrienos (LT); tromboxanos (TX). (Youdim, 2000)

1.10.1 Ácidos Graxos Essenciais e Plasticidade Sináptica

Várias linhas de pesquisa hoje vêm demonstrando a importância dos ácidos graxos essenciais, principalmente do ácido araquidônico (AA), em eventos relacionados com fortalecimento sináptico e plasticidade, em processos de aprendizado e memória. O AA pode se difundir através da membrana celular e modular uma série de funções como liberação de neurotransmissores e atividade

de canais iônicos. Assim, o AA funciona como um mensageiro retrógrado, modificando a função de elementos pré-sinápticos em resposta a uma ativação pós-sináptica (Schaechter & Benowitz, 1993)

Neste sentido, o AA vem sendo sugerido como um importante sinalizador na expressão da LTP. Nishizaki (1999) demonstrou que estimulações de alta frequência em fatias de hipocampo geravam um aumento na liberação de AA. Também foi observada uma maior concentração de AA quando foi aplicado glutamato exogenamente, sendo que esse aumento foi inibido tanto por DNQX, antagonista do receptor AMPA/Kainato, quanto por APV, antagonista do receptor NMDA, revelando que a elevação nos níveis de AA ocorre como resultado da ativação de receptores ionotrópicos glutamatérgicos. Além disso, o AA induziu a facilitação da transmissão sináptica no hipocampo, consistente com o seu papel na LTP. Estes estudos sugerem que o AA é produzido na célula pós-sináptica por ativação da PLA2, sendo este evento mediado por transmissão excitatória, com aumento no influxo de cálcio através da ativação de receptores NMDA (Nishizaki *et al.*, 1999; Leu & Schmidt, 2008).

Este mecanismo de ação do AA na LTP parece ser mediado por mudanças no terminal pré-sináptico por ativação da proteína cinase C (PKC). A inibição da enzima rompe o padrão de organização das aferências, aumentando a dinâmica dos ramos axonais, e conseqüentemente afetando processos de estabilização sináptica. (Schmidt *et al.*, 2004). Além disso, PKC é ativada em situações de LTP mediadas pelo receptor NMDA. A ativação de PKC promove fosforilação de diversos substratos, sendo o principal alvo a proteína associada ao crescimento GAP-43 (GAP-43), conhecida por promover crescimento neuronal, regulando a

dinâmica da proteína f-actina. (Luo & Vallano, 1995; Schmidt *et al.*, 2004). A fosforilação da GAP-43 está associada a uma persistente LTP e com a potenciação da liberação de neurotransmissores, além da modificação da morfologia sináptica (Schaechter & Benowitz, 1993).

Estudos do nosso laboratório demonstraram que o ácido araquidônico desempenha um importante papel na manutenção dos axônios e sinapses centrais (Campello-Costa *et al.*, 2006). Utilizando o sistema visual de roedores como modelo experimental, os autores estudaram a distribuição espacial dos axônios que conectam a retina ao colículo superior. Para tal, foram realizados experimentos de mapeamento das conexões retinotectais através da injeção intraocular de um traçador neuroanatômico, a peroxidase (HRP). Este estudo analisou a distribuição topográfica em grupos de animais entre a quarta e a sexta semana após o nascimento, idade onde o sistema nervoso central de roedores se apresenta plenamente desenvolvido. Foram analisados animais submetidos ao bloqueio farmacológico das enzimas fosfolipase A2 (PLA2), lipoxigenase e ciclooxigenase, além de animais tratados com os respectivos veículos através de injeções intraperitoneais durante 7 dias. Os resultados apresentados mostram claramente que enquanto os animais tratados com veículo apresentam marcação de axônios e terminais restritos a pequenos aglomerados na região ventral das camadas visuais, os animais tratados com quinacrina (40 mg/kg ip), substância que induz o bloqueio da PLA2, impedindo assim a liberação de AA na sua forma livre, apresentaram uma grande dispersão dos axônios retinotectais pelas camadas visuais do colículo superior (FIGURA 12). Em outra série de experimentos os autores demonstraram que o bloqueio da lipoxigenase (enzima

da via do AA) na quarta ou sexta semana após o nascimento reproduzem os efeitos obtidos pelo bloqueio farmacológico da PLA2. Estes resultados sugerem que o ácido araquidônico (AA) e seus metabólicos sejam importantes para a manutenção em longo prazo das conexões no sistema nervoso central (SNC).

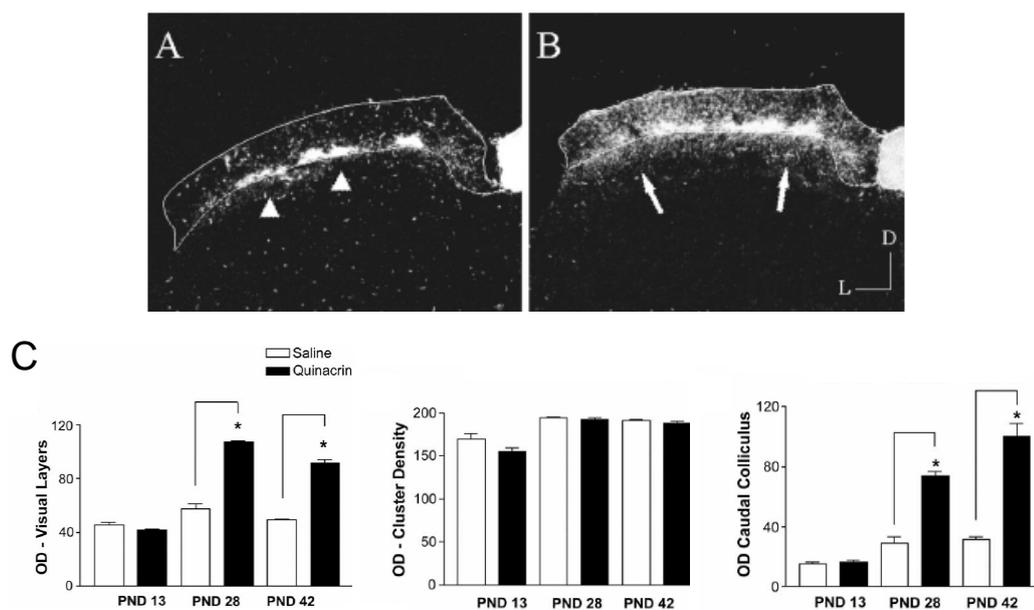


FIGURA12: Papel da via de ácido araquidônico em ratos juvenis e adultos jovens: manutenção da organização de topografia retinotectal. Fotomicrografias de campo escuro de ratos adultos (DPN28) demonstram a organização da topografia retinotectal com aglomerados de marcação na região ventral do CS em (A). O bloqueio farmacológico da PLA2 rompe a topografia, com espalhamento de terminais axonais para camadas mais superficiais do CS em (B). (C) Análises quantitativas da densidade óptica das camadas visuais, densidade de cluster e da região caudal do CS confirmaram os resultados, indicando que o AA é importante na manutenção da topografia em idades tardias do desenvolvimento de roedores (DPN28 e DPN42). Abreviaturas: densidade óptica (OD); dia pós-natal (PND). (Campello-costa et al, 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Considerando a importância dos ácidos graxos essenciais como componentes integrais das membranas neuronais e por desempenharem um importante papel como mensageiros retrógrados na transmissão sináptica, utilizamos neste trabalho dietas restritas em ácidos graxos omega-3 e omega-6 a fim de investigarmos o impacto da restrição nutricional na formação, manutenção e plasticidade de conexões do sistema visual.

2.2 Objetivos específicos:

- Analisar o papel dos ácidos graxos essenciais (AGEs) na manutenção da topografia das projeções retinotectais ipsolaterais de animais adultos, no dia pós-natal 28 (DPN28) e no dia pós-natal 42 (DPN42), com a utilização de dieta controle (óleo de soja), dieta comercial (controle padrão) e dieta restrição em AGEs (óleo de coco).
- Investigar os efeitos da restrição dos AGEs na reorganização retinotectal em um modelo plasticidade induzida, através de uma lesão temporal de retina.
- Avaliar a expressão da proteína associada ao crescimento GAP-43 em animais DPN28 submetidos à dieta controle (óleo de soja) e à dieta restrição de AGEs (óleo de coco).

- Analisar a expressão das subunidades GluR1 e GluR2 do receptor ionotrópico glutamatérgico AMPA, nos colículos superiores de animais adultos que receberam as dietas controle e restrição até DPN28.

3 METODOLOGIA

Foram utilizados ratos da linhagem Lister Hooded (animais pigmentados) no dia pós-natal (DPN) 28 e DPN 42. Foram utilizados dois protocolos para obtenção dos resultados. Um protocolo nos permitiu observar os mecanismos de plasticidade natural do sistema visual, através da observação das projeções retinotectais. O segundo protocolo utilizado nos possibilitou avaliar as alterações em um modelo de estudo de plasticidade induzida, por lesão de retina.

Para obtenção dos resultados foram utilizadas técnicas neuroanatômicas (histoquímica para HRP) e western blotting.

3.1 Dietas

Os animais foram divididos em dois grupos e submetidos a tipos diferentes de alimentação. As duas dietas utilizadas eram normocalóricas, normoproteicas e normoglicídicas, porém diferenciadas com relação ao conteúdo lipídico. Foi utilizada ainda a dieta comercial Nuvital® como controle padrão de nosso estudo.

A dieta do grupo controle (AGE+) apresentava como fonte de lipídios o óleo de soja, rico em ácidos graxos essenciais, tanto da família ω -3 quanto ω -6. Dessa forma, o grupo obteve durante todo o seu desenvolvimento as quantidades necessárias de AGE para roedores, de acordo com a AIN-93. Já a dieta do grupo de animais, denominado grupo restrição (AGE-), possuía como base lipídica o óleo de coco, sendo este alimento composto primordialmente de ácidos graxos saturados (TABELA 1 E 2). As dietas foram fornecidas pela Universidade Federal

de Pernambuco (UFPE), através do Departamento de Nutrição e do Departamento de Fisiologia.

TABELA 2: Componentes básicos das dietas do grupo controle e grupo restrição.

Composição	Quantidade
Caseína	414g
Óleo de coco ou de soja	100 ml
Açúcar	420g
Celulose	36g
Amido (maisena)	936g
Complemento mineral da Rhoster	74g
Complemento vitamínico da Rhoster	18g
DL-metionina ou L-cistina	2g
Butil (BHT) como antioxidante	0,002g

Fonte: (Reeves *et al.*, 1993)

TABELA 3: Composição centesimal das dietas utilizadas no tratamento dos animais.

	Dieta Controle (AGE+)	Dieta Restrição (AGE-)
Umidade e substâncias		
Voláteis (g/100g)	3,77	3,78
Proteínas (g/100g)	18,46	18,88
Cinzas (g/100g)	3,43	3,53
Lipídios (g/100g)	5,59	5,95
Carboidratos (g/100g)	68,75	67,86
Valor Calórico Total (VCT) (kcal/100g)	399,15	400,51
Ferro (mg/100g)	10,34	8,15
Cálcio (mg/100g)	541,51	523,89
Sódio (mg/100g)	43,81	47,78
Potássio (mg/100g)	136,48	145,32
Fósforo (mg/100g)	641,60	631,86

Métodos: Adolfo Lutz, 2005; by calculation, ASCAR, 1985.

3.2 Tratamento dos animais

Para o tratamento dos grupos com as diferentes rações, foram separadas gaiolas com três fêmeas cada. Em cada gaiola foi, então, disponibilizada a ração controle ou a ração restrição. Ainda foram utilizadas como controle padrão gaiolas com animais alimentados com dieta comercial Nuvital®. As dietas foram plenamente aceitas pelos animais dos dois grupos, sendo oferecidos 30 gramas de ração para cada animal por dia (30g/dia). As fêmeas do grupo tratado com a dieta deficiente em ácidos graxos essenciais (AGEs) foram alimentadas durante cinco semanas antes da etapa de acasalamento, de modo a depletar os estoques endógenos de AGEs e impedindo, desta forma, a transferência placentária desses lipídios para a prole durante a gestação ou através do leite materno, após o nascimento. O protocolo de cinco semanas foi pré-estabelecido de acordo com as observações do tratamento realizado nos laboratórios de Nutrição e de Fisiologia e Farmacologia da UFPE.

Fêmeas dos dois grupos foram, então, submetidas ao acasalamento. Durante a gestação e após o nascimento as ninhadas foram mantidas na mesma alimentação das fêmeas até as idades estudadas (FIGURA 13).

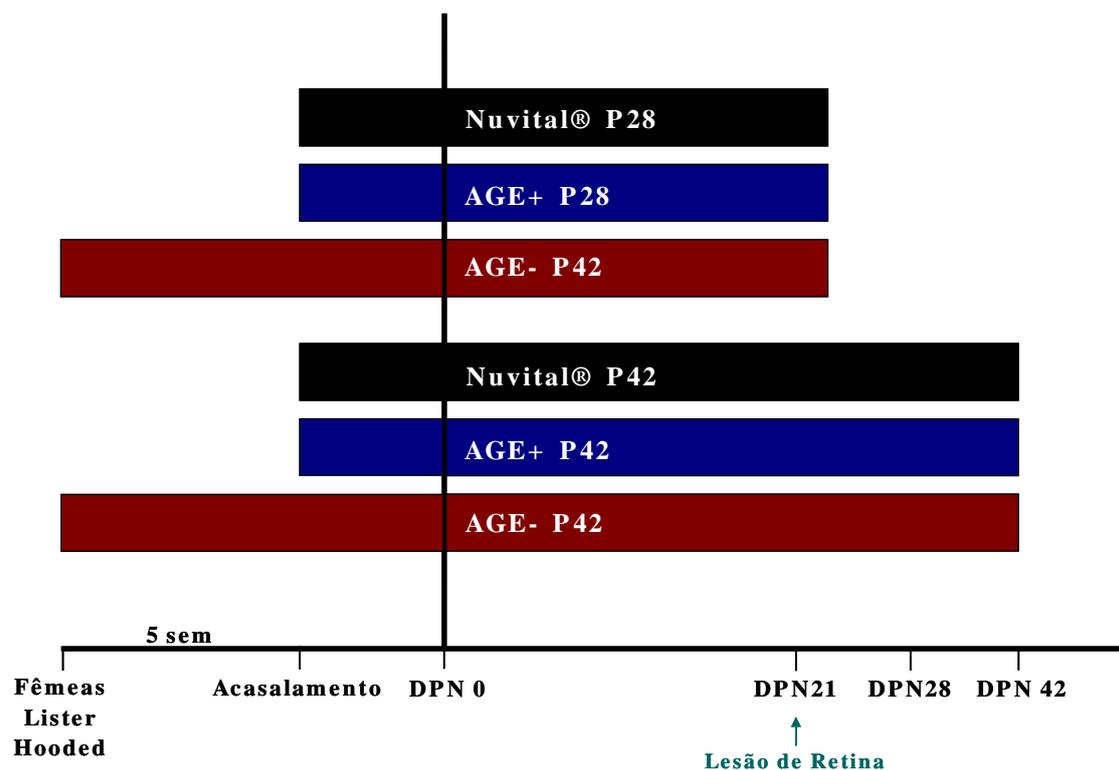


FIGURA 13: Gráfico representativo dos três tipos de dietas utilizados e seus respectivos grupos experimentais para o estudo da plasticidade retinotectal.

3.3 Estudo anterógrado das projeções retinotectais: injeção intraocular de peroxidase (HRP 30%)

Para a realização dos experimentos utilizamos como traçador neuroanatômico a peroxidase da raiz forte (HRP tipo VI - Sigma). Durante este procedimento, a peroxidase é transportada de forma anterógrada pelos axônios das células ganglionares da retina, através do nervo óptico, até o colículo superior. Os animais tanto do grupo controle (AGE+), quanto do grupo restrição (AGE-), em DPN27 e DPN41, foram anestesiados em uma solução de éter e água (1:1). Após anestesia, os animais foram submetidos a uma pequena incisão no limbo do olho direito com auxílio de uma lâmina de bisturi nº12, onde foi introduzida a ponta de uma microseringa (Hamilton®) contendo 5µl de uma

solução contendo HRP 30%, dimetilsulfóxido (DMSO) 2% em NaCl 0,9%. Após 24 horas, os animais foram então sacrificados e submetidos à perfusão com soluções de aldeídos.

3.4 Estudo da plasticidade retinotectal em um modelo de lesão de retina temporal

Animais submetidos aos dois tipos de dieta receberam no dia pós-natal 21 (DPN21) lesão em setor restrito da retina temporal, sendo os animais previamente anestesiados com solução de éter e água em uma proporção de 1:1 (Serfaty *et al.*, 2005). Com o auxílio de uma lâmina de bisturi nº12, foi realizada uma penetração na retina temporal através da esclera, região entre o limbo e o disco óptico. Esta lesão permite a secção dos axônios das células ganglionares da retina ocasionando a degeneração anterógrada e a conseqüente desnervação da região ântero-lateral do colículo superior.

Os animais foram mantidos nas mesmas condições de tratamento durante uma semana após a lesão, para então em DPN27 ser realizada a injeção com o traçador neuroanatômico.

3.5 Perfusão e fixação

Nas idades desejadas para obtenção dos resultados, DPN28 e DPN42, os animais sob anestesia profunda foram perfundidos através do coração com solução salina (NaCl 0,9%) durante 10min e em seguida com solução fixadora de Karnowski (paraformaldeído 1% + glutaraldeído 2% diluídos em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4) durante 20 minutos. Logo após a fixação, os cérebros foram

removidos e transferidos para uma solução de sacarose 20% diluída em tampão fosfato 0.1M (pH 7,4), onde foram mantidos em geladeira (4°C) por pelo menos 24 horas.

Após a crioproteção, os cérebros foram congelados em gelo seco durante cerca de 15 minutos e então mantidos em freezer -70°C até o processamento. Os cérebros foram cortados em criostato fixado a uma temperatura de -15°C, onde foram realizadas secções coronais de 40µm. Todos os cortes referentes à região do colículo superior foram recolhidos.

3.6 Processamento histológico para HRP

O processamento histoquímico para visualização da HRP transportada foi realizado através da utilização de tetrametilbenzidina (TMB), um cromógeno que forma precipitados em células marcadas com o traçador (HRP). Seguindo o protocolo estabelecido por Mesulam (1978), os cortes dos cérebros dos animais foram recolhidos em tampão fosfato 0,1M pH 7,4 e mantidos em geladeira (4°C) por 24 horas (Mesulam, 1978). Em seguida, os cortes receberam uma seqüência de 3 lavagens de 30s com água milliQ e foram então pré-incubados em uma solução com 10ml de tampão acetato 0,2M pH 3,3, 185ml de água milliQ, 180mg de nitroprussiato de sódio e 10mg de tetrametilbenzidina dissolvidos em 2ml de álcool por 20min. Após este período, foi acrescentado 40µl de peróxido de hidrogênio diluídos em 4ml de água milliQ por mais 20 min. Em seguida, os cortes foram lavados em tampão acetato 0,05M, pH 3,3, em seis etapas de 10 minutos cada, e montados em lâminas gelatinizadas, sendo mantidas em

temperatura ambiente até o dia seguinte. Ao final do experimento, as lâminas foram desidratadas em álcool absoluto durante 5 segundos, clarificadas em duas trocas de 5 minutos cada em xilol e montadas com lamínulas utilizando Entelan (Merk).

3.7 Análise das amostras

Analisamos o padrão de distribuição de axônios provenientes das células ganglionares da retina no colículo superior durante o desenvolvimento normal ou após a plasticidade induzida das projeções retinotectais ipsolaterais através da lesão na retina temporal contralateral. Após uma análise qualitativa preliminar, o material foi fotografado em campo escuro com aumento de 100x. As imagens foram digitalizadas através de câmera digital acoplada ao microscópio óptico Zeiss. As fotos foram gravadas no computador em máxima definição com formato tiff.

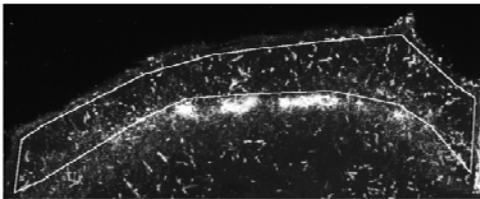
O material utilizado para análise quantitativa apresentava as seguintes características:

- Marcação homogênea no colículo contralateral. Este parâmetro demonstra a distribuição homogênea do traçador após a injeção intraocular;
- Pouco *background* na reação histoquímica, o que indica a baixa marcação inespecífica;
- Visualização de fibras e campos terminais no SGS ipsilateral à injeção do traçador;

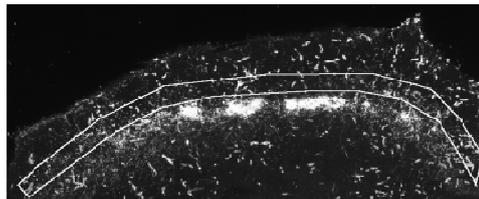
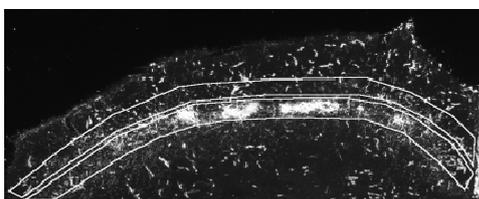
- Em animais submetidos à lesão de retina temporal caracterizamos o efeito da lesão de retina no terço anterior do CS.

Para quantificação, foram selecionados os 5 cortes seqüenciais (situados entre 200 e 600 μm após o início do colículo) que refletiram a maior reorganização superficial dentre os cortes observados de cada animal. Utilizamos o programa Scion Image versão beta 4.0.2 para quantificação dos resultados obtidos. O programa nos permite delimitar, qualitativamente, áreas do colículo superior com diferentes faixas de intensidade de marcação. Desta forma pode-se determinar quantitativamente a distribuição de fibras e terminais axonais das projeções das CGR, através da obtenção de valores de densidade óptica referente às áreas delimitadas (FIGURA 14). A densidade óptica do *background* foi definida pela análise de uma área específica estabelecida na região de maior marcação inespecífica dos cortes.

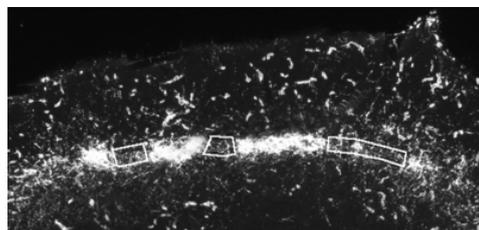
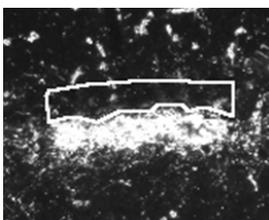
DO SGS Dorsal



DO SGS Intermediária

 $\frac{\text{Índice DO Intermediária SGS}}{\text{DO Área de Cluster}}$ 

DO Intercluster

DO Região Dorsal
Periférica ao Cluster

DO Região Subpial

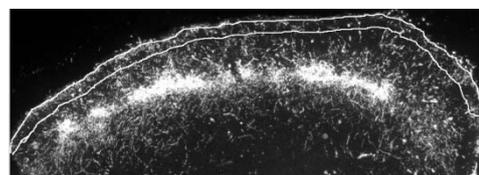


FIGURA 14: Representação esquemática das análises realizadas. Fotomicrografias de campo escuro demonstram as áreas delimitadas no colículo superior para avaliação da densidade óptica.

3.8 Western Blotting

Os animais de ambos os grupos AGE+ e AGE-, em DPN28, foram anestesiados e sacrificados por decapitação. As camadas superficiais do colículo superior foram dissecadas, com auxílio de um bisturi N° 15. O tecido foi transferido para um homogeneizador e macerado dentro do gelo em 200 μ L tampão de homogeneização (TABELA 4). As amostras de cada grupo de animais são formadas por 4 colículos/200 μ L de amostra, ou seja, 2 animais/amostra.

TABELA 4: Composição do tampão de Homogeneização

Solução	Volume	Concentração Final
Tris Base	500 μ l	20 mM
MgCl ₂	500 μ l	10 mM
CaCl ₂	500 μ l	0,6 mM
EGTA	500 μ l	--
DTT	50 μ l	0,5 mM
Aprotinina	12,5 μ l	5 μ g/ml
Leupeptina	5 μ l	2 μ g/ml
TX – 100	25 μ l	0,05%
PMSF	50 μ l	1mM

A dosagem de proteína era realizada no mesmo dia em que as amostras foram preparadas. O método utilizado foi de Bradford, o qual utiliza como padrão à albumina sérica bovina (Bradford, 1976). Após a dosagem das amostras, era adicionado azul de bromofenol a 0,2%, sendo 10% do volume total da amostra.

Após a dosagem, as amostras foram padronizadas de modo a apresentar a mesma quantidade de proteína em cada raia do gel de eletroforese. Foi realizado um cálculo, de modo que as amostras fossem compostas: pelo volume do tecido

macerado, encontrado após a dosagem das proteínas; 20 µl de tampão SDS 5x; volume restante complementado com o tampão de homogeneização utilizado no preparo das amostras. Dessa forma, o volume final de cada amostra era de 100 µl. As amostras foram conservadas à -70 °C, para posteriormente serem submetidas à eletroforese.

Em um primeiro momento, as amostras que seriam utilizadas eram levadas a fervura por cerca de 8 minutos. Com as amostras prontas, era realizado western blotting para visualizar a expressão da proteína GAP-43 na sua forma fosforilada (pGAP-43), além das subunidades GluR1 e GluR2 do receptor AMPA. Foram utilizados 40 µg de proteína em 20 µl de amostra para correr em um gel SDS/PAGE 10%. A corrida era realizada em média durante 2 horas e 30 minutos com amperagem constante, a 20 mA. Após a finalização da corrida, era realizada a transferência para membranas de PVDF. A transferência ocorria em 1 hora com a voltagem fixada entre 45-60 V. Em seguida, realizava-se o bloqueio dos sítios inespecíficos com uma solução de bloqueio de TBS-T + 5% de leite em pó desnatado por duas horas. Logo após, as membranas eram lavadas uma vez por 5 minutos com TBS-T e incubadas com os anticorpos específicos: primário policlonal de cabra anti-pGAP-43 (diluição de 1:800); anticorpo primário policlonal de coelho anti-GluR1 (diluição de 1:100); anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-GluR2 (diluição de 1:500) durante 24 horas. Após a etapa de 24 horas, as membranas eram lavadas 3 vezes por 10 minutos com TBS-T, incubadas com anticorpo secundário específico na respectiva diluição por 1 hora, lavadas mais 2 vezes com TBS-T e uma vez com TBS e, só então, reveladas em filmes radiográficos após exposição ao reagente ECL.

O controle de carregamento das proteínas no gel de eletroforese foi realizado através da incubação da membrana com a solução vermelho de Ponceau que permitiu a análise da eficiência da transferência, bem como a visualização de todas as proteínas presentes em cada amostra.

TABELA 5: Relação de anticorpos utilizados, concentrações e fonte de obtenção

Anticorpos	Origem	Fonte	Diluição
Anticorpos Primários			
Anti-pGAP-43	Cabra	Santa Cruz	1:800
Anti-GluR1	Coelho	Calbiochem	1:100
Anti-GluR2	camundongo	Chemicon	1:500
Anticorpos Secundários			
Anti-IgG de cabra	burro	Amersham Bioscience	1:3000
Anti-IgG de coelho	burro	Santa Cruz	1:5000
Anti-IgG de camundongo	ovelha	Amersham Bioscience	1:5000

3.9 Análise estatística dos resultados

Os gráficos foram confeccionados através do programa Graph Pad Prism versão 4.0 em que foi utilizado o teste estatístico de análise de variância (*One-way ANOVA*) com pós-teste de Tukey para realizar a comparação entre os grupos experimentais. Para a análise dos experimentos de western blotting, utilizamos ainda o teste t pareado. Consideramos como significativos valores com $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Avaliamos a restrição de ácidos graxos essenciais através da elaboração de três grupos: animais controle padrão, os quais receberam a dieta comercial para roedores Nuvital®; animais pertencentes ao grupo controle interno da dieta, que receberam como fonte lipídica óleo de soja (grupo AGE+); e o grupo experimental (grupo AGE-), cujos animais foram alimentados com dieta restrita em AGE, sendo o óleo de coco o lipídio oferecido.

Foram analisados, para os três grupos, animais adultos em DPN28 e DPN42, com o padrão topográfico do sistema retinotectal já maduro. As idades observadas foram escolhidas de acordo com os resultados prévios de nosso laboratório, que indicaram que o bloqueio farmacológico da PLA2 promovia o brotamento das projeções retinotectais em idades mais tardias do desenvolvimento, não ocorrendo alterações na topografia durante o período crítico (Campello-Costa *et al.*, 2006).

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (AGE+ e AGE-) com relação ao número de animais por ninhada, além do comprimento e peso dos animais. Parâmetros somáticos como abertura dos olhos, descolamento do pavilhão auditivo não apresentaram alterações evidentes entre o tratamento controle e o tratamento restrito em AGEs.

4.1 Efeitos da Restrição dos Ácidos Graxos Essenciais (AGE) na Manutenção das Conexões no Sistema Retinotectal em animais adultos jovens

A análise da marcação terminal de animais alimentados com dietas controle e experimental até DPN 28 mostrou que os animais DPN28 submetidos ao tratamento com dieta controle (AGE+) apresentaram um padrão de marcação compatível com o apresentado em animais adultos normais (dieta Nuvital®). Nestes grupos controle observamos densos aglomerados de marcação terminal na borda ventral entre o SGS e o SO. Nestes animais AGE+, observou-se ainda uma baixa densidade de fibras e terminais nas camadas visuais do CS ao longo do estrato cinzento superficial e estrato zonal (SGS/SZ), assim como a virtual ausência de marcação em cortes caudais do núcleo. Animais submetidos à restrição crônica de AGE apresentaram um padrão indicativo de desorganização topográfica, com espalhamento de fibras na região anterior do CS, um aumento do número de aglomerados confluentes além de um aumento de marcação terminal no SGS/SO. Também foi observado um aumento na marcação de fibras em cortes caudais do colículo superior (FIGURA 15).

Os resultados obtidos pela análise qualitativa foram confirmados através de testes duplo cego nos quais o observador era estimulado a discriminar entre os grupos AGE+ e AGE- com base nos padrões de distribuição dos axônios retinotectais. Nestes testes, o observador foi capaz de listar corretamente 60% (3 de 5) dos animais AGE+ e 60% dos AGE- (6 de 10) para animais alimentados até DPN 28 e 57% (4 de 7) dos animais AGE+ e 61,5% (8 de 13) dos AGE- para os animais alimentados até DPN 42.

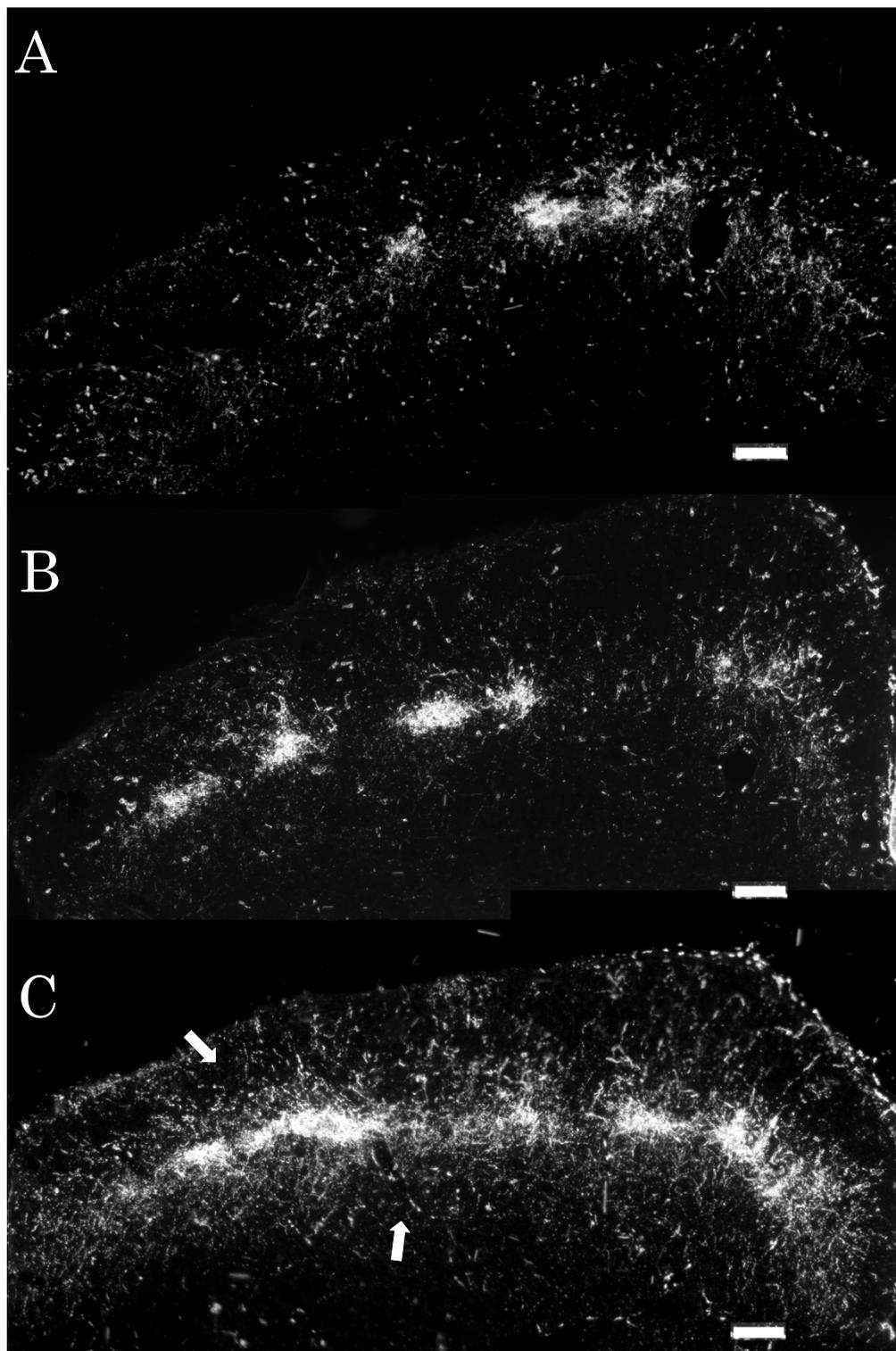


FIGURA 15: Fotomicrografias de campo escuro de cortes coronais de colículo superior (CS) de ratos DPN28 evidenciando em (A) animais alimentados com dieta padrão Nuvital® com aglomerados de marcação focalizados na região ventral do CS, (B) grupo alimentado com dieta com óleo de soja (AGE+) com padrão semelhante ao grupo Nuvital® e em (C) grupo alimentado com dieta com óleo de coco (AGE-). As setas indicam um aumento no número de fibras ao redor dos aglomerados ventrais das projeções ipsilaterais. Barra de calibração: 100 μ m.

Os diferentes grupos experimentais foram então submetidos a uma avaliação quantitativa através da análise de densidade óptica de regiões específicas do SGS. A análise da densidade óptica (DO) da área superficial situada dorsalmente aos aglomerados de marcação (região intermediária do SGS – SGS-I) indicou que os animais AGE⁻ ($10,73 \pm 4,75/ n=4$) apresentaram um aumento na DO nesta área, quando comparados com o grupo AGE⁺ ($5,26 \pm 2,74 /n=4$) e o controle padrão Nuvital® ($2,72 \pm 1,01/ n=3$) (FIGURA 16A). Quando observamos a relação entre a análise anterior e a DO da camada de aglomerados, os animais submetidos à dieta restrita em AGE (AGE⁻: $0,3654 \pm 0,0448/ n=4$) obtiveram o dobro do valor do índice em relação aos controles (Nuvital®: $0,1177 \pm 0,0581/ n=3$; AGE⁺: $0,1516 \pm 0,0641/ n=4$), corroborando o resultado qualitativo (FIGURA 16B). Os resultados quantitativos também indicaram uma dispersão de axônios e terminais na região ventral do CS nos animais restritos em AGEs (FIGURA 16C), mais precisamente nos espaços localizados entre aglomerados adjacentes (região *intercluster* ou IC) revelando uma desorganização intralaminar das projeções ipsolaterais (Nuvital®: $20,06 \pm 7,56/ n=3$; AGE⁺: $33,42 \pm 5,94/ n=4$; AGE⁻: $45,87 \pm 15,88/ n=4$) .

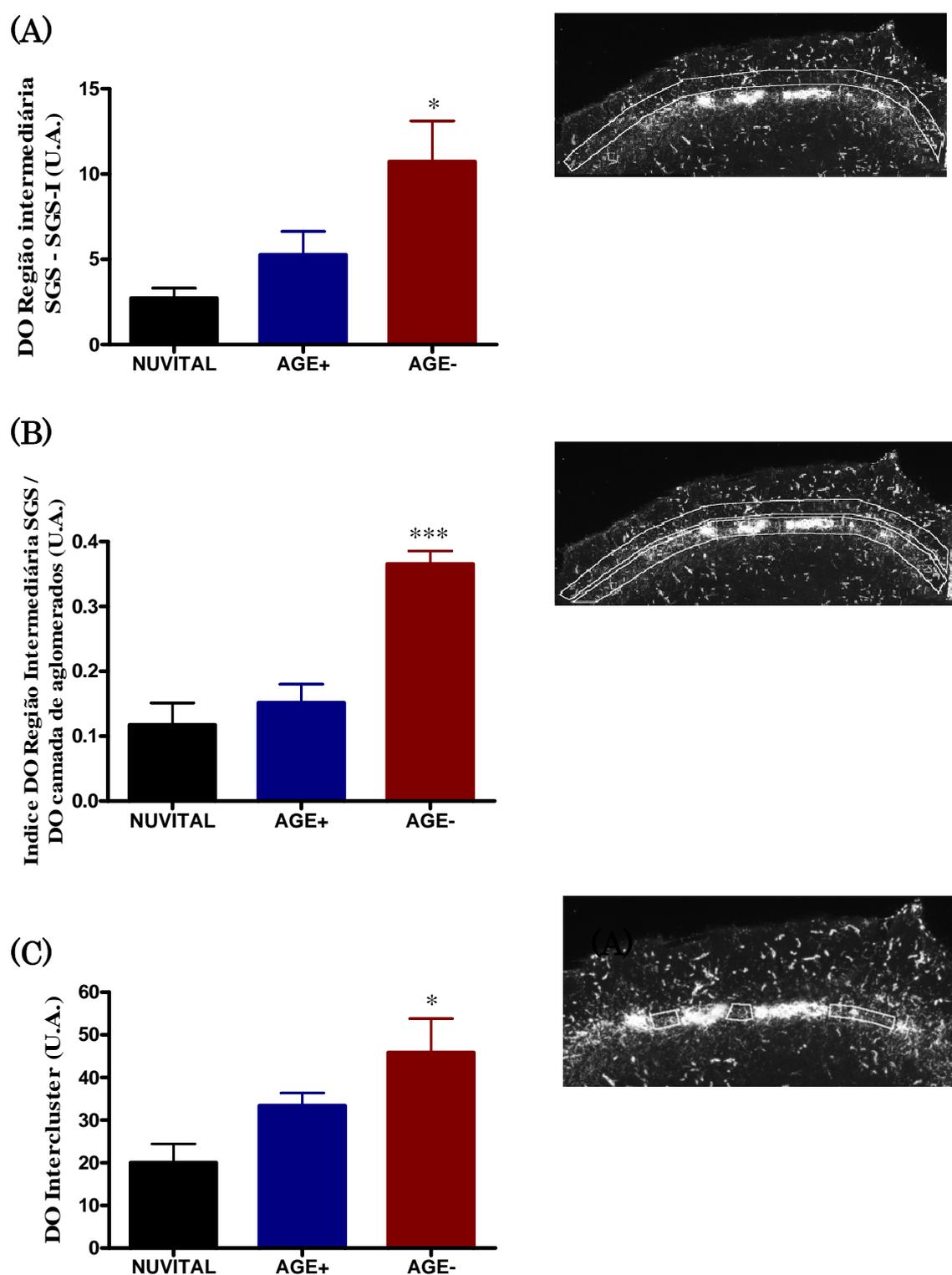


FIGURA 16: Análises quantitativas dos efeitos dos AGEs na estabilização das projeções ipsolaterais no colículo superior de animais DPN28. (A) Análise da DO da região intermediária do SGS (SGS-I); (B) Relação da DO SGS-I / DO da camada de aglomerados; (C) DO da região intercluster (IC). Nuvital® n= 3, AGE+ n=4, AGE- n=4. * para $p < 0,05$; *** para $p < 0,001$. Ao lado dos histogramas são apresentadas fotomicrografias de campo escuro de CS que demonstram as áreas avaliadas em cada análise.

4.2 Efeitos da Restrição dos Ácidos Graxos Essenciais (AGE) na Manutenção das Conexões no Sistema Retinotectal em animais na 6ª semana pós-natal (adultos)

A restrição nutricional de AGEs até a 6ª semana pós-natal produziu efeitos semelhantes àqueles obtidos com os animais restritos até DPN28. O grupo AGE+ apresentou um padrão semelhante ao grupo alimentado com a ração Nuvital, com aglomerados de marcação definidos na região ventral do CS, pouca marcação terminal nas regiões intermediária e superficial do SGS, assim como a virtual ausência de marcação em cortes caudais do CS. Nos animais tratados com a dieta restrição em AGEs, houve um rompimento da topografia fina, com dispersão das projeções para áreas mais superficiais do SGS (regiões intermediária e dorsal), além de fusão dos aglomerados adjacentes na camada ventral do SGS (FIGURA 17).

As análises quantitativas confirmaram as observações, evidenciando que a ausência de AGEs na dieta durante o desenvolvimento provoca alterações na estabilização das projeções retinotectais.

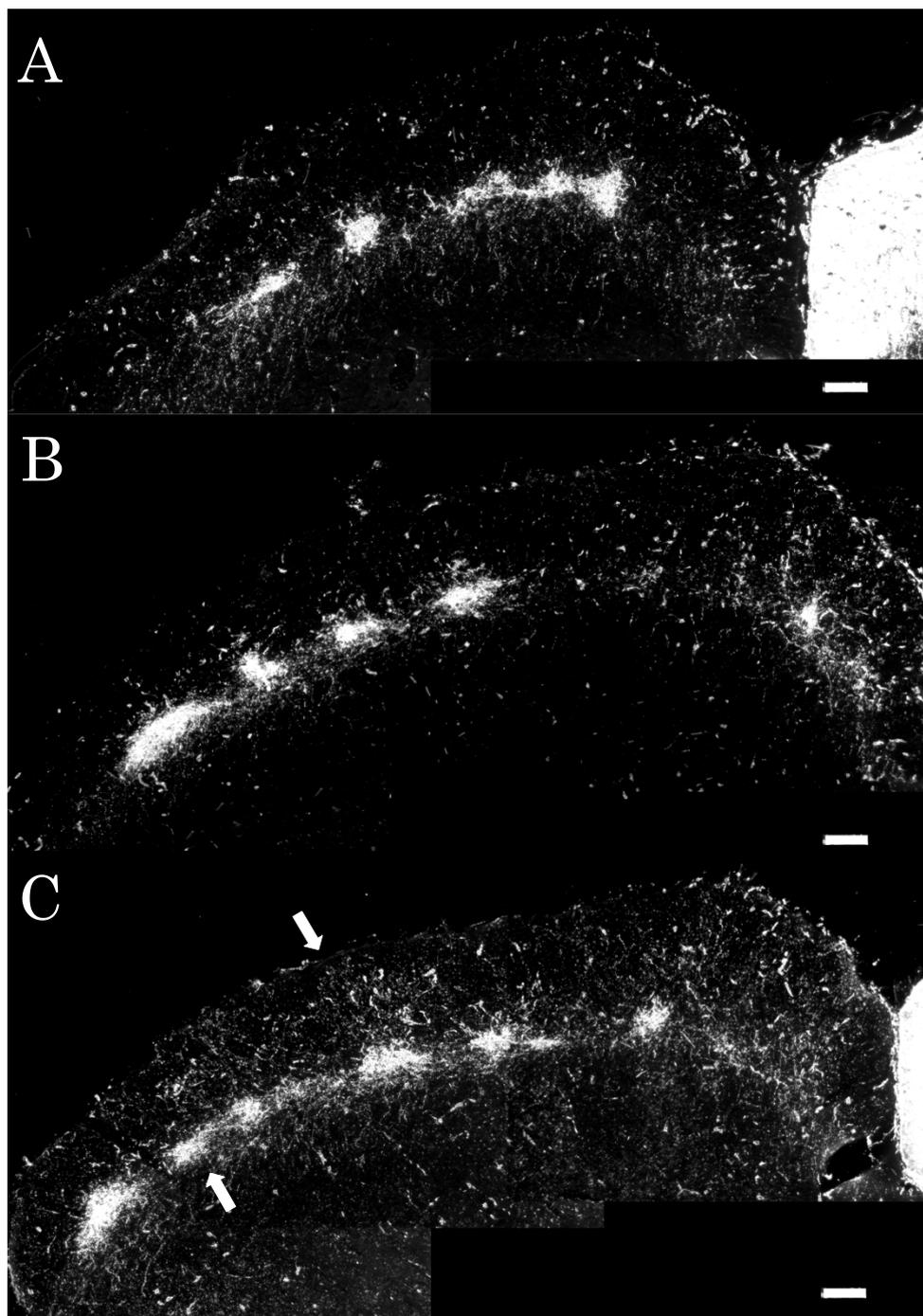


FIGURA 17: Fotomicrografias de campo escuro de cortes coronais de colículo superior (CS) de ratos DPN42 demonstrando em (A) animais alimentados com dieta padrão Nuvital® com aglomerados de marcação focalizados na região ventral do CS, (B) grupo alimentado com dieta rica em AGEs (AGE+), com padrão semelhante ao observado no grupo Nuvital® e em (C) As setas indicam a dispersão das projeções ipsolaterais no grupo restrito em AGEs (AGE-), demonstrando a desestabilização das projeções ipsolaterais em fases tardias do desenvolvimento. Barra de calibração: 100 μ m.

Corroborando os resultados encontrados nos animais DPN28, o grupo DPN42 alimentado com a dieta restrita em AGE obteve um aumento na DO na região intermediária do SGS - SGS-I ($10,47 \pm 2,86/ n=6$), quando comparado à dieta Nuvital ($2,57 \pm 0,58/ n=4$) e ao grupo AGE+ ($4,09 \pm 1,51/ n=4$), assim como um aumento na relação entre a DO da região intermediária dos SGS (análise anterior) e a DO da camada de aglomerados (Nuvital: $0,0834 \pm 0,0116/ n=4$; AGE+: $0,1615 \pm 0,0875/ n=4$; AGE-: $0,2758 \pm 0,0575/ n=6$). Os valores obtidos nas análises de DO intercluster indicaram um aumento na densidade de fibras no grupo AGE- ($45,41 \pm 13,90/ n=6$), confirmando o espalhamento intralaminar das projeções ipsolaterais (Nuvital: $27,12 \pm 3,57/ n=4$; AGE+: $26,32 \pm 5,87/ n=4$) (FIGURA 18).

Em conjunto, os resultados denotam a importância dos ácidos graxos essenciais na estabilização e manutenção das conexões retinotectais.

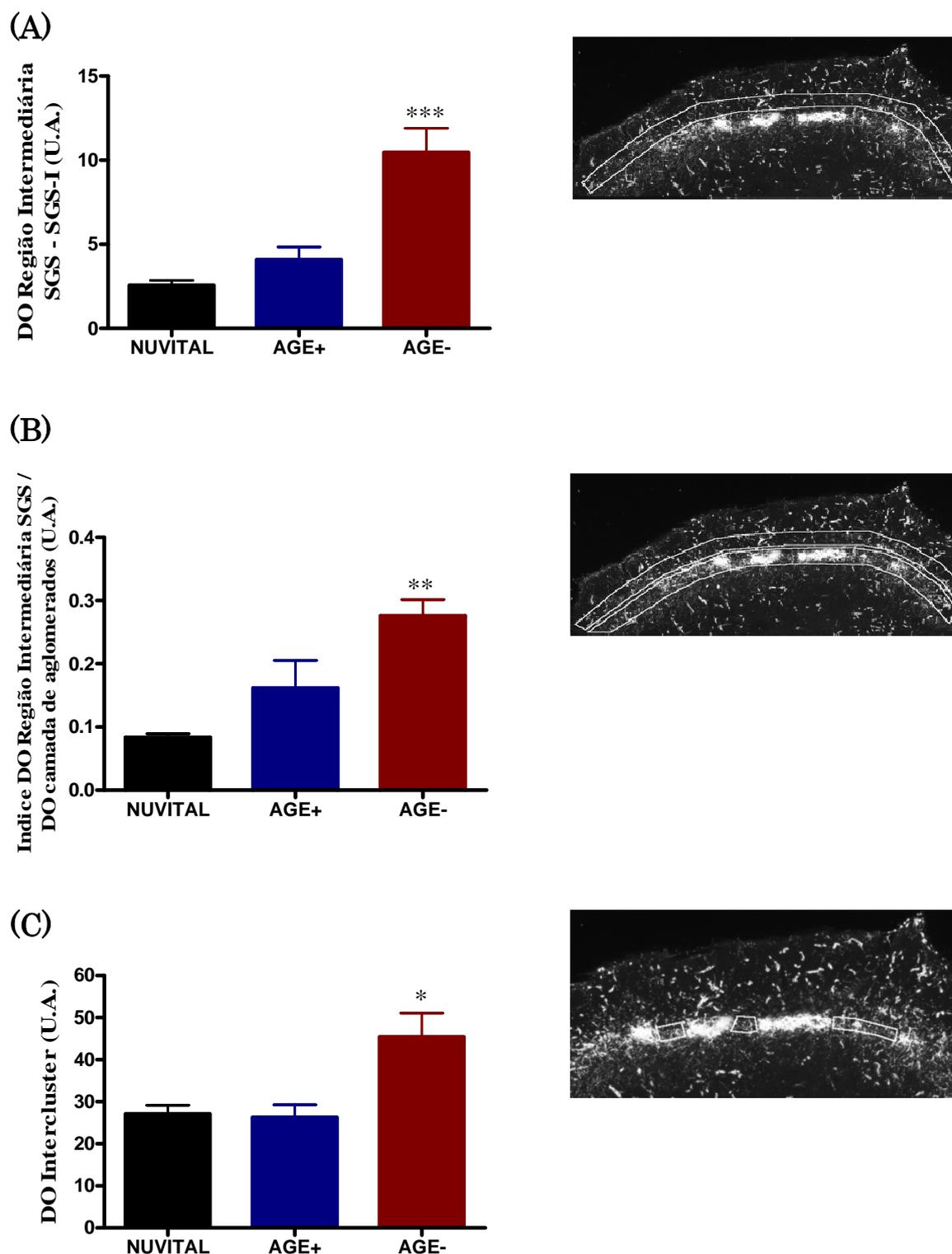


FIGURA 18: Análises quantitativas dos efeitos dos AGEs na estabilização das projeções ipsolaterais no colículo superior de animais DPN42. (A) Análise da DO da região intermediária do SGS (SGS-I); (B) Relação da DO SGS-I / DO da camada de aglomerados; (C) DO da região intercluster (IC). Nuvital® n= 4, AGE+ n=4, AGE- n=6. * para $p < 0,05$; ** para $p < 0,001$; *** para $p < 0,001$. Ao lado dos histogramas são apresentadas fotomicrografias de campo escuro de CS que demonstram as áreas avaliadas em cada análise.

4.3 Análise da Região Caudal do Colículo Superior dos animais DPN28 e DPN42

Analizamos também o padrão de densidade de fibras nas porções mais caudais do CS. Observamos um aumento na DO nos cortes mais caudais do CS nas duas idades estudadas (DPN28 e DPN42), o que indica que a ausência de AGEs também promove a ruptura da topografia retinotectal visualizada no eixo ântero-posterior (FIGURA 19).

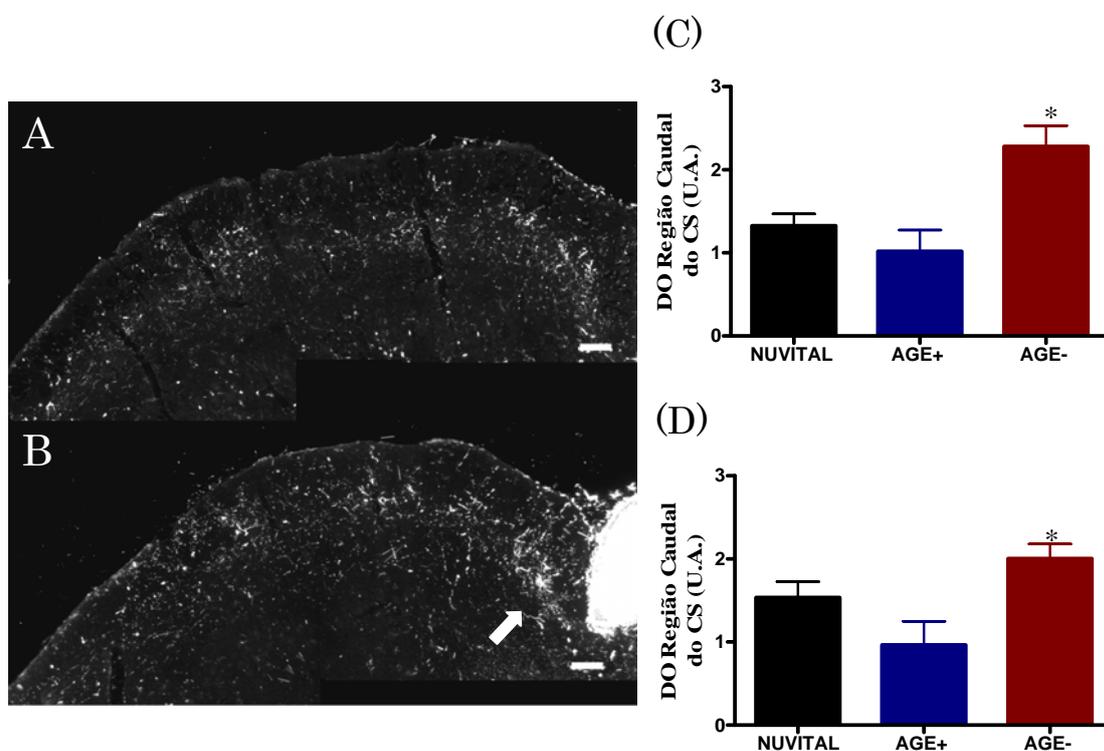


FIGURA 19: Efeitos da restrição de ácidos graxos essenciais (AGEs) na região caudal do colículo superior (CS) de animais adultos (DPN28/DPN42). Fotomicrografias de campo escuro de cortes coronais de CS de animais DPN28 demonstram em (A) animais do grupo controle (AGE+), com a presença de poucas fibras pela superfície do CS. Em (B), o tratamento com dieta restrita em AGE promove a dispersão das projeções retinotectais com aumento na densidade de fibras na região caudal do CS. (C e D) Histogramas representativos das análises de densidade óptica (DO) da região caudal em animais DPN28 (Nuvital®: n=3; AGE+: n=3; AGE-: n=4) e DPN42 (Nuvital®: n=4; AGE+: n=3; AGE-: n=6). * para $p < 0,05$. Barra de calibração: 100 μm .

4.4 Efeitos da restrição nutricional dos AGEs na reorganização das projeções ipsolaterais na plasticidade induzida por lesão de retina

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento normal, sugerem que a restrição dos ácidos graxos essenciais promove a desestabilização do mapa topográfico que se encontra alterado mesmo em animais adultos (DPN42). Estes dados são compatíveis com um atraso de desenvolvimento o que levaria a um atraso no período crítico de plasticidade retinotectal. Desta forma, estudamos as alterações provenientes da ausência de AGEs na reorganização das projeções retinotectais após uma lesão unilateral da retina temporal contralateral, condição experimental que induz o brotamento de axônios ipsolaterais do olho intacto durante o período crítico retinotectal (até DPN 21) (Serfaty *et al.*, 2005).

Ratos alimentados com dietas AGE⁻ e AGE⁺, conforme protocolo anterior, foram submetidos a uma lesão unilateral de retina em P21 e foram mantidos por uma semana de sobrevivência. Em DPN27 os animais receberam a injeção intravítrea de HRP para a obtenção da marcação anterógrada dos axônios retinotectais ipsolaterais do olho intacto.

O grupo controle, em que os animais foram alimentados com dieta rica em ácidos graxos essenciais (AGE⁺), exibiram aglomerados de marcação bem definidos no limite ventral do CS, com raras fibras esparsas nas regiões mais superficiais do SGS/SZ (FIGURA 20A). O padrão de marcação na metade lateral das camadas visuais (onde seria esperada a observação de brotamento dos axônios em direção à superfície do CS) era idêntico àquele observado na metade medial do CS, indicando que uma lesão na retina temporal contralateral em DPN 21 não foi capaz de induzir reorganização significativa dos axônios do olho

intacto. Esta observação vai de acordo com os trabalhos anteriores, que indicam que animais adultos jovens com uma semana de sobrevivência após lesão não apresentam uma reorganização importante frente à indução de plasticidade (Serfaty *et al.*, 2005). Diferentemente do grupo controle, os animais pertencentes ao grupo restrito em AGE (grupo AGE- / DPN21-28) exibiram uma grande reorganização das projeções ipsolaterais, com expansão da marcação terminal na camada ventral do SGS e redução do espaço entre aglomerados adjacentes, efeitos anteriormente observados através do tratamento com a dieta AGE-. Entretanto, além dessas alterações, os animais restritos submetidos a lesão de retina apresentaram intensa marcação nas camadas mais superficiais do CS, especialmente na região lateral do SZ, característico da resposta plástica pós-lesão (FIGURA 20B). Esta observação foi confirmada através da análise da DO da região subpial do CS (FIGURA 21).

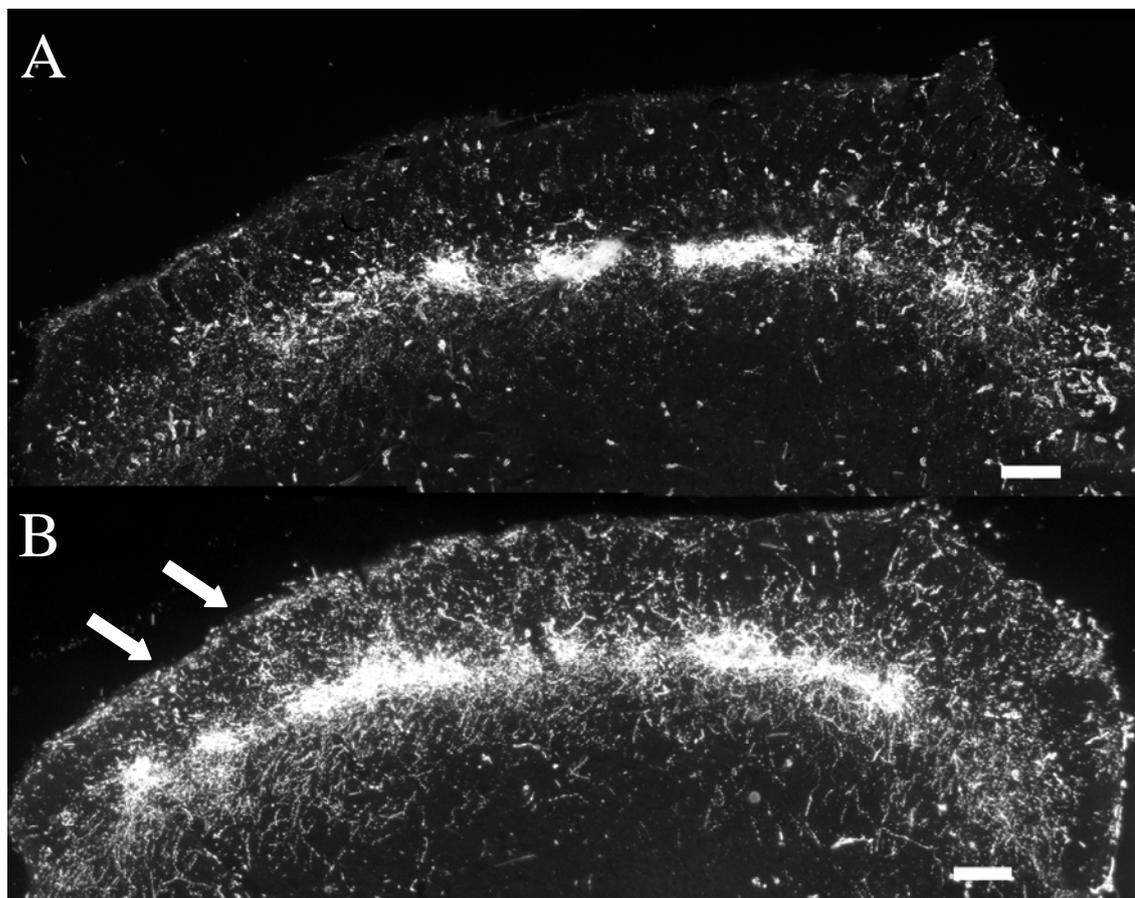


FIGURA 20: Efeitos da restrição nutricional crônica de ácidos graxos essenciais (AGEs) na reorganização das projeções ipsilaterais em um modelo de lesão. Animais em DPN21 receberam uma lesão de retina temporal e foram mantidos por 1 semana de sobrevida para realização dos experimentos. (A) Animais AGE+ apresentaram pouca reorganização das projeções ipsilaterais frente à lesão, com fibras esparsas pela superfície do CS. (B) O grupo AGE- apresentou forte reorganização das projeções ipsilaterais, com espalhamento de fibras para regiões superficiais do CS e dispersão intralaminar na borda ventral. Notar padrão bilaminar de marcação indicado pelas setas. Barra de calibração: 100 μ m.

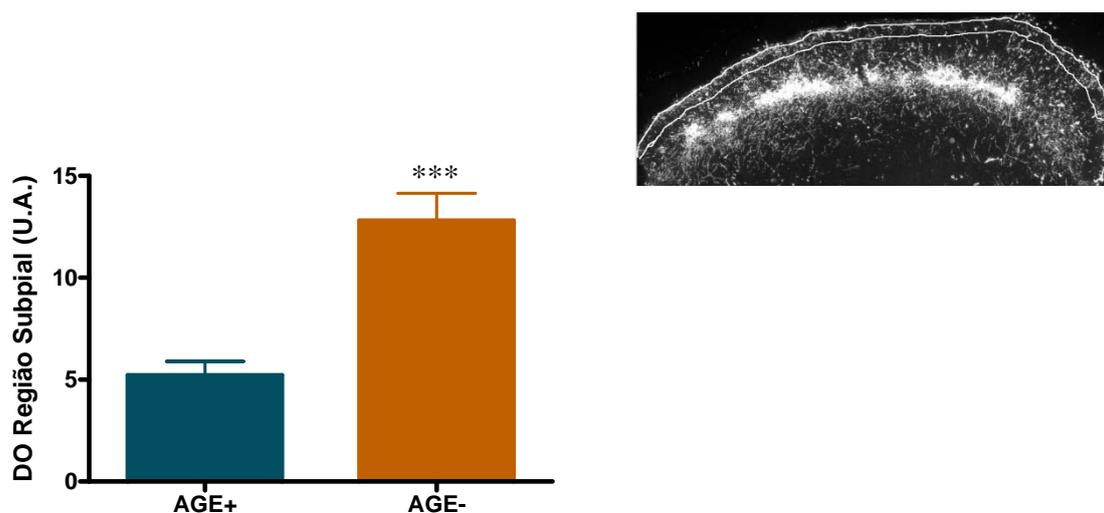


FIGURA 21: Análise quantitativa da densidade óptica (DO) da região subpial do CS. O grupo AGE- (DPN21-28) após lesão de retina temporal obteve um aumento na DO desta área, em comparação ao tratamento controle (AGE+/DPN21-28). AGE+ n= 6; AGE- n=6. *** para $p < 0,001$.

As análises quantitativas confirmaram as observações, indicando que os animais AGE- apresentaram aumento na densidade de marcação nas camadas mais superficiais do SGS nos animais AGE- ($16,89 \pm 4,78$), resultado demonstrado também pelo aumento na DO periférica dorsal aos aglomerados de marcação (AGE-: $47,11 \pm 10,39 - n=7$ / AGE+: $26,19 \pm 9,05 - n=6$). Foi observado ainda aumento na DO intercluster no grupo AGE- ($74,85 \pm 17,42/ n=7$) em comparação ao grupo controle ($43,47 \pm 7,60/ n=6$), reafirmando o espalhamento intralaminar das projeções ipsilaterais na região ventral do CS (FIGURA 22).

Os resultados revelam o mesmo perfil observado em animais com inibição da atividade da PLA2 (Campello-Costa *et al.*, 2006), que assim como o tratamento nutricional, com apenas uma semana de sobrevida, exibiram um forte rearranjo de suas conexões.

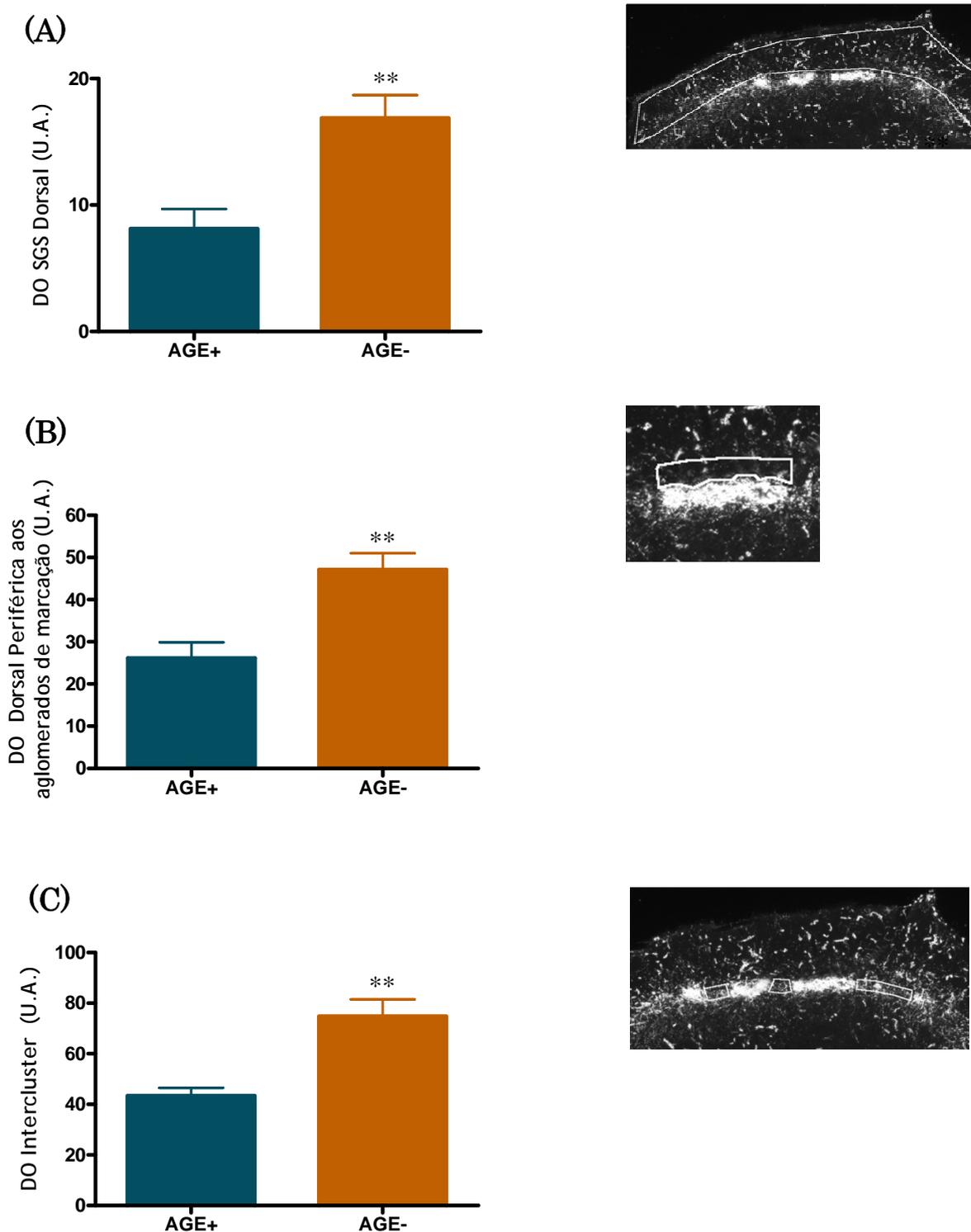


FIGURA 22: Histogramas demonstrando o efeito da restrição de AGEs na reorganização das projeções retinotectais em animais que receberam lesão de retina temporal em DPN21 e analisados em DPN28. (A) Análise da DO da região dorsal do SGS; (B) DO da região dorsal periférica a camada de aglomerados; (C) DO da região intercluster (IC). AGE+ n=6, AGE- n=7. ** para $p < 0,001$. Ao lado dos histogramas são apresentadas fotomicrografias de campo escuro de CS que demonstram as áreas avaliadas em cada análise.

4.5 Avaliação da expressão das subunidades do receptor AMPA no colículo superior dos animais alimentados com as dietas AGE+ e AGE-

Durante o desenvolvimento, as conexões neuronais se remodelam extensivamente em diversas áreas do sistema nervoso. Estes eventos de plasticidade dependem, dentre outros fatores, de atividade sincrônica entre neurônios e facilitação da transmissão sináptica. No sistema retinotectal especificamente, sabe-se que o glutamato medeia grande parte da transmissão excitatória através de seus respectivos receptores ionotrópicos NMDA e AMPA (Nishizaki *et al.*, 1999; Liu & Chen, 2008).

Durante o desenvolvimento das sinapses glutamatérgicas, os receptores AMPA (AMPA) são adicionados em sinapses inicialmente formadas por receptores NMDA (NMDAR). A adição de AMPAR está relacionada com mecanismos de estabilização sináptica e dinâmica da arborização dendrítica. No hipocampo e neocortex, as subunidades predominantemente expressas são a GluR1 e GluR2. A inserção de receptores AMPA contendo subunidade GluR1 é induzida pela atividade NMDAR, resultando em potenciação sináptica. A incorporação de GluR2 é independente de atividade e ocorre através da reciclagem dos AMPAR sinápticos já existentes (Barry & Ziff, 2002).

Sabe-se que alterações no fortalecimento sináptico podem ocorrer por mecanismos pré-sinápticos, que podem interferir na liberação de neurotransmissores. Modificações no número e na atividade de receptores AMPA são uma das formas mais importantes de modulação da transmissão sináptica. Como nossos resultados anatômicos revelaram uma tendência à perda de estabilidade de terminações axonais com brotamento não-específico de novas

conexões, avaliamos o efeito da restrição nutricional de ácidos graxos essenciais (AGE) no padrão de expressão das subunidades GluR1 e GluR2 no cóliculo superior após o período crítico de desenvolvimento (DPN28).

Os resultados indicaram um aumento de quatro vezes na expressão da subunidade GluR1, assim como na expressão de GluR2 nos animais AGE- quando comparados ao grupo controle (FIGURA 23 E 24).

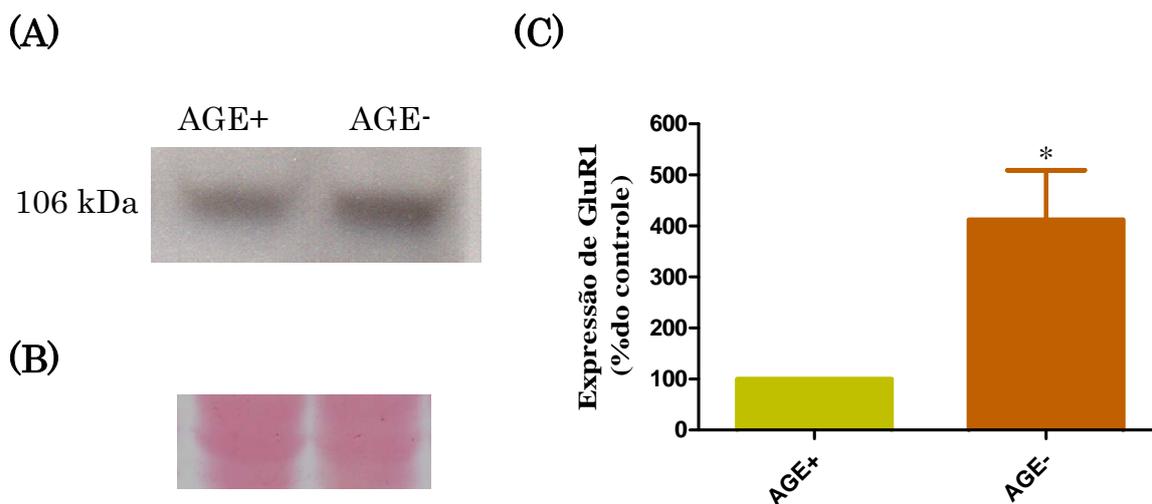


FIGURA 23: Efeitos da restrição de ácidos graxos essenciais na expressão da subunidade GluR1 do receptor AMPA. (A) Detecção da expressão de GluR1 no CS de animais DPN28. A expressão de GluR1 aumentou no grupo restrição (AGE-), em comparação ao controle (AGE+). (B) Controle de carregamento em que a membrana utilizada no experimento foi corada com vermelho de Ponceau. (C) Análise quantitativa confirmando um aumento da expressão de GluR1 nos animais restritos em AGEs. n= 6. * para $p < 0,05$.

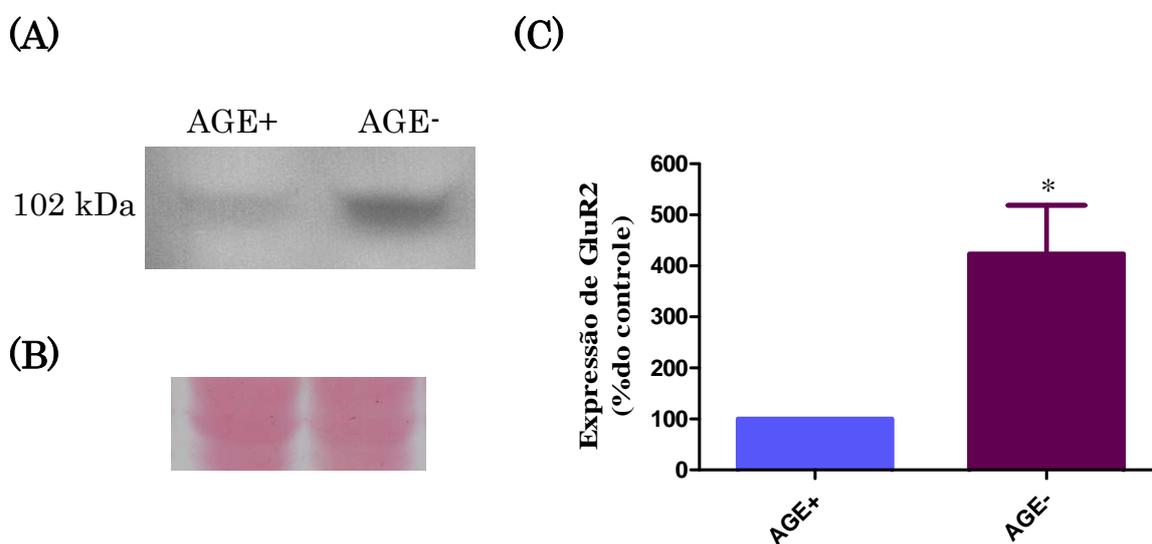


FIGURA 24: A restrição de ácidos graxos essenciais aumenta a expressão da subunidade GluR2 do receptor AMPA. (A) Detecção da expressão de GluR2 no CS de animais DPN28. A expressão de GluR2 aumentou cerca de quatro vezes no grupo restrição (AGE-), em comparação ao controle (AGE+). (B) Controle de carregamento em que a membrana utilizada no experimento foi corada com vermelho de Ponceau. (C) Análise quantitativa confirmando um aumento da expressão de GluR1 nos animais restritos em AGEs. n= 4. * para $p < 0,05$.

4.6 Papel dos ácidos graxos essenciais na modulação da expressão da proteína associada ao crescimento GAP-43

Os resultados anteriores nos sugerem a importância dos ácidos graxos essenciais na modulação e estabilização das conexões sinápticas em fases tardias do desenvolvimento do sistema nervoso. A partir de então, buscamos demonstrar o papel desses lipídios bioativos na regulação de proteínas relacionadas a eventos de crescimento axonal e plasticidade.

A proteína associada ao crescimento GAP-43 é uma proteína pré-sináptica presente em cones de crescimento. Inicialmente encontra-se altamente expressa durante o desenvolvimento neuronal, associada a eventos de crescimento neurítico. Entretanto, sua expressão pode ser observada também em idades mais tardias, estando, portanto relacionada a mecanismos de remodelamento sináptico e estabilização de conexões. Estudos demonstram que o aumento no estado de fosforilação da GAP-43 (pGAP-43) está diretamente envolvida na neurotransmissão glutamatérgica (Luo & Vallano, 1995; Iannazzo, 2001).

Neste sentido, buscamos estudar os efeitos da restrição de AGE na regulação da expressão da GAP-43 na sua forma fosforilada (pGAP-43). Para tal, os animais do grupo AGE⁺ e AGE⁻ foram mantidos em suas respectivas dietas até DPN28, quando foram realizados os experimentos para preparo das amostras.

A determinação dos resultados através de *western blotting* apontou que animais com restrição de AGEs apresentaram menor expressão de pGAP-43 em seus colículos superiores, quando comparados com o grupo controle (FIGURA 25). A quantificação das bandas de marcação evidenciou uma redução significativa de

58% na expressão da proteína pGAP-43 entre o grupo AGE⁻ quando comparado ao grupo AGE⁺ (FIGURA 23).

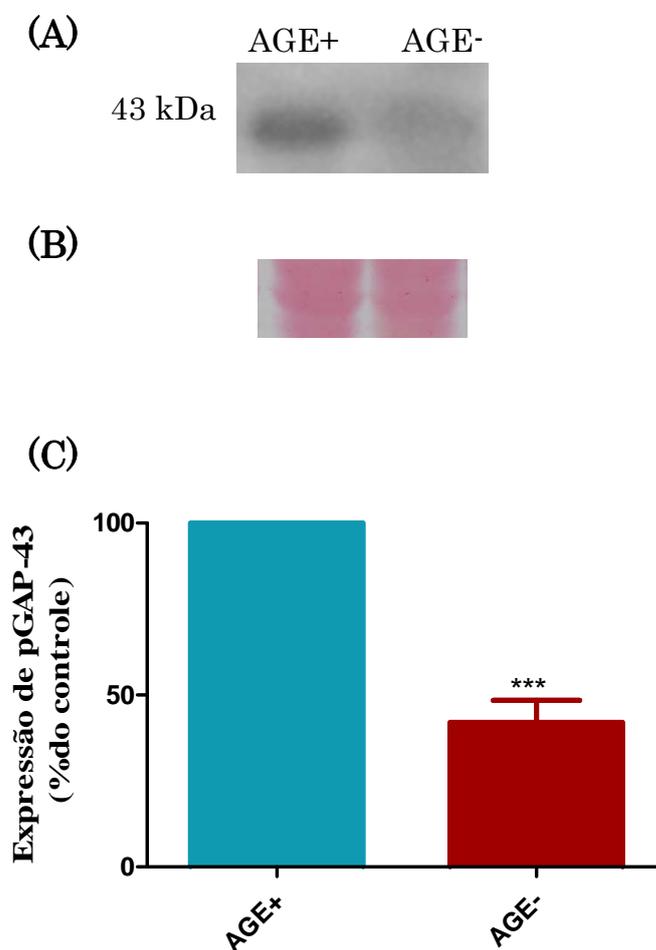


FIGURA 25: Restrição nutricional crônica de ácidos graxos essenciais interfere na expressão de GAP-43 fosforilada (pGAP-43). (A) Detecção da expressão de pGAP-43 em no CS de animais DPN28. O grupo AGE⁻ apresentou uma menor expressão da proteína pGAP-43, quando comparado ao grupo controle AGE⁺. (B) Controle de carregamento em que a membrana utilizada no experimento foi corada com vermelho de Ponceau. (C) Análise quantitativa do resultado confirmando um diminuição de 58% da expressão de pGAP-43 nos animais com alimentação restrita em AGEs. n= 11. *** para p<0,001.

5. DISCUSSÃO

Os ácidos graxos essenciais (AGEs) são importantes no desenvolvimento cerebral e na plasticidade sináptica, participando em eventos de fortalecimento sináptico e na regulação da função neural por aumentar a fluidez e função das membranas neuronais, no controle da expressão gênica e mediando eventos de sinalização celular (Bazan, 2005; Chen & Bazan, 2005).

A infância e o envelhecimento são considerados períodos sensíveis, nos quais a biodisponibilidade adequada de ácidos graxos essenciais (AGEs) e ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) de cadeia longa é crucial para o funcionamento apropriado do SNC, importante para o desenvolvimento das funções cognitivas e visuais. A deficiência de AGPI de cadeia longa nesses períodos gera efeitos no aprendizado e memória, função sensorial e comportamento. Trabalhos recentemente publicados evidenciam as conseqüências da deficiência de ácidos graxos essenciais, em decorrência da redução da ingestão de alimentos fontes por conta das dietas modernas, com conseqüentes déficits neurológicos pela falta desses nutrientes. (Marszalek & Lodish, 2005).

5.1 Restrição de ácidos graxos essenciais altera a topografia retinotectal

O processamento adequado dos sentidos depende da formação precisa de circuitos neurais durante o desenvolvimento. As representações topograficamente organizadas da superfície receptora permitem a interpretação da informação sensorial, resultando em uma melhor habilidade cognitiva, fundamental para o

estabelecimento da individualidade e singularidade humana (Serfaty et al, 2008) (Lemke & Reber, 2005).

Através de uma abordagem nutricional, investigamos os efeitos dos ácidos graxos essenciais na manutenção das conexões do sistema visual de ratos. Os resultados indicaram que a restrição nutricional de ácidos graxos essenciais promove uma alteração na topografia retinotectal após o período crítico, ou seja, em uma fase do desenvolvimento onde o sistema já está maduro e as sinapses se mantêm estabilizadas em pontos específicos (DPN28 e DPN42). Animais alimentados com a dieta restrita (AGE-) apresentaram uma reorganização nas projeções ipsolaterais, com dispersão de fibras para regiões mais superficiais do CS (FIGURAS 15 E 17), confirmado pela análise quantitativa que revelou um aumento da densidade óptica nas regiões dorsais do SGS/SZ (FIGURAS 16A E 18A). Foi observado ainda um espalhamento intralaminar dos terminais axonais, indicado pelo aumento na densidade de fibras entre os aglomerados de marcação na região ventral do CS (DO intercluster – FIGURAS 16C E 18C).

A formação da topografia da via visual subcortical em mamíferos se encerra ao final do período crítico, que é caracterizado pela presença de aglomerados de marcação terminal descontínuos na região ventral do CS. Campello-Costa (2006) já havia demonstrado evidências de que a via do ácido araquidônico modula a estabilização de projeções retinotectais ipsolaterais após a terceira semana pós-natal em roedores. O tratamento farmacológico com injeções sistêmicas de quinacrina, bloqueador da atividade da PLA2, induziu o brotamento dos terminais axonais para camadas mais superficiais do CS, condizente com estágios iniciais do desenvolvimento. Os resultados encontrados,

portanto, corroboram com os apresentados previamente (Campello-Costa *et al.*, 2006), e sugerem que a privação crônica de AGEs interfere na estabilização sináptica. Estes resultados refletem um processo de reorganização tardia das projeções em função de alterações na sinalização retrógrada ou, alternativamente, um atraso no desenvolvimento no padrão topográfico retinotectal.

As conexões neurais se desenvolvem e são mantidas ativamente por meio de interações neuroquímicas entre neurônios e seus alvos. No sistema retinotectal, sabe-se que o refinamento das projeções depende da ativação de NMDAR, que controla a dinâmica das árvores axonais pré-sinápticas. O bloqueio de NMDAR aumenta a dinâmica de adição e eliminação de ramos axonais no sistema em desenvolvimento, sugerindo a existência de um sinal liberado da célula pós-sináptica, regulando a dinâmica do citoesqueleto (Schmidt, 1990). Trabalho realizado por Leu et al (2008) demonstrou que a inibição da PLA2 do tecto óptico, impedindo a liberação de AA na célula pós-sináptica, produz efeitos semelhantes aos encontrados com o bloqueio do receptor NMDA, com aumento na dinâmica dos ramos dendríticos, maior adição e deleção de ramos, além de serem observados ramos mais longos, característicos de um padrão imaturo do sistema.

O AA pode regular a transmissão glutamatérgica através de mecanismos pré-sinápticos, modulando a liberação de glutamato, ou ainda apresentar efeitos pós-sinápticos, aumentando as correntes através de receptores NMDA (NMDAR) (Schmidt *et al.*, 2004). O desenvolvimento e estabilização da transmissão retinotectal envolve ativação de NMDAR e LTP, associado com aumento de correntes AMPAR (Nishizaki *et al.*, 1999). Os nossos resultados refletem os

efeitos observados por Leu et al (2008), visto que a restrição nutricional de AGEs promoveu a dispersão de fibras para camadas mais superficiais do CS, evidenciando o papel desses nutrientes na dinâmica axonal, possivelmente por interferir na liberação de glutamato e/ou alterar a atividade dos receptores pós-sinápticos glutamatérgicos.

5.2 Efeitos dos ácidos graxos essenciais em um modelo de lesão

A reorganização da via retinotectal ipsolateral induzida por lesão de retina representa um modelo para o estudo da plasticidade dos aferentes subcorticais primários no sistema nervoso central.

Estudos anteriores já demonstraram efeitos da lesão em regiões específicas da retina na reorganização das projeções ipsolaterais do olho intacto. Animais em estágios iniciais do desenvolvimento, após receberem lesão de retina temporal, apresentaram uma denervação na região ântero-lateral do CS contralateral ao olho lesado, e uma conseqüente migração das projeções ipsolaterais, do olho intacto, para regiões mais superficiais, gerando um padrão bilaminar de marcação terminal. Lesões de retina em idades mais tardias, após o período crítico, induzem rearranjos sutis, sendo observado aumento na densidade de fibras apenas três semanas após lesão. O tratamento farmacológico com quinacrina por uma semana em animais adultos (DPN21-28) exibiu uma reorganização marcante das projeções ipsolaterais, sugerindo um papel do ácido araquidônico e/ou seus metabólitos na manutenção de sinapses retinotectais (Serfaty *et al.*, 2005; Campello-Costa *et al.*, 2006). Dessa forma, avaliamos o efeito da restrição nutricional de AGEs na reorganização das projeções no modelo

de plasticidade pós-lesão. Animais alimentados com dieta AGE- até DPN28, mantidos em sobrevida por uma semana após a lesão de retina (DPN20-28) apresentaram uma expressiva dispersão das projeções para as regiões mais superficiais do CS, sendo observado um padrão bilaminar de marcação semelhante ao padrão observado em animais em fases iniciais do desenvolvimento submetidos ao mesmo protocolo de plasticidade (FIGURA 20). Ainda foi constatado o espalhamento intralaminar dos terminais axonais, confirmado pelo aumento da densidade óptica intercluster (FIGURA 22C).

Estes dados sugerem que perturbações na transmissão sináptica em decorrência da ausência de sinalização retrógrada por meio do bloqueio farmacológico da síntese de AA (Campello-Costa *et al.*, 2006) ou através da restrição nutricional de AGEs reduzem a estabilidade de conexões previamente formadas e possibilitar o crescimento axonal, mesmo após o término do período crítico. Os resultados são alternativamente consistentes com um atraso no padrão de maturação retinotectal, já que conexões imaturas apresentam um padrão semelhante de dispersão de axônios nas camadas visuais do colículo (Linden & Serfaty, 1985). Este atraso de desenvolvimento poderia alterar a janela temporal do período crítico o que explicaria o aumento de plasticidade observado após uma lesão de retina.

5.3 Papel dos lipídios bioativos na plasticidade sináptica

Os estágios tardios do refinamento sináptico observados durante o período crítico são mediados principalmente por mecanismos celulares de potenciação de

longa duração (LTP) e depressão de longa duração (LTD), resultando, respectivamente, na formação de conexões precisas características do padrão adulto e na eliminação das sinapses transitórias (Cohen-Cory, 2002).

A LTP foi demonstrada primeiramente no hipocampo, onde a estimulação elétrica de alta frequência gera padrões de atividade sincrônicos em células correlacionadas, consistente com o fortalecimento de sinapses Hebbianas. Já a estimulação de baixa frequência (cerca de 1 Hz) promove uma progressiva diminuição na eficácia sináptica, caracterizando o fenômeno da LTD (Bliss & Gardner-Medwin, 1973; Sjostrom *et al.*, 2008). LTP e LTD são mecanismos descritos no córtex visual (e somatossensorial) durante os períodos críticos (Berardi *et al.*, 2000). Especificamente na via retinotectal, estudo realizado por Lo & Mize (2002) demonstrou a importância dos fenômenos de LTP e LTD para o refinamento destas projeções. A LTD é observada em maior intensidade na primeira semana do desenvolvimento pós-natal de roedores, ao passo que a LTP aumenta sua magnitude a partir da segunda semana pós-natal (Lo & Mize, 2002).

O mecanismo de ação da LTP depende do influxo de cálcio (Ca^{2+}) mediado pelo receptor NMDA (NMDAR) (Holt & Harris, 1993; Sheng & Kim, 2002; Ruthazer & Cline, 2004). A atividade pareada e a forte ativação de NMDAR aumentam as concentrações intracelulares de Ca^{2+} , fortalecendo as sinapses e gerando estabilização que é consistente com a LTP, enquanto uma fraca ativação teria o efeito oposto, levando a processos de eliminação sináptica, observados na LTD (Sabatini *et al.*, 2001; Cohen-Cory, 2002; Ruthazer & Cline, 2004). Pelo fato do Ca^{2+} ser um importante segundo mensageiro, seus altos níveis provenientes a

ativação de NMDAR gera respostas intracelulares que incluem a ativação de proteínas cinases envolvidas no fortalecimento sináptico. Entretanto, uma menor atividade NMDAR preferencialmente ativa proteínas fosfatases, associada à LTD e conseqüentemente ao enfraquecimento das conexões. (Wigstrom & Gustafsson, 1985; Penn & Shatz, 1999)

Diversos trabalhos evidenciam a importância dos AGEs na sinalização retrógrada, principalmente do AA e do DHA, na regulação da neurotransmissão excitatória. Contudo, esses ácidos graxos podem sofrer a ação de uma série de enzimas e que, ao serem clivados, geram a formação de compostos lipídicos importantes nos processos de estabilização sináptica. Eicosanóides, endocanabinóides e o fator de ativação plaquetária (PAF) são os lipídios bioativos mais estudados os quais atuam como mensageiros retrógrados na plasticidade sináptica e processos de memória, assim como em condições patológicas e de injúria.

As ciclooxigenases (COXs) participam da conversão do AA em eicosanóides. A enzima ciclooxigenase 2 (COX-2) é constitutivamente expressa em diversas regiões do SNC como hipocampo e córtex, sendo sua ativação induzida por citocinas, fatores de crescimento e outros mediadores lipídicos. Neurônios do hipocampo expressam COX-2 em condições basais. Entretanto, sua expressão também pode ser modulada pela atividade sináptica envolvendo receptores NMDA. (Bazan, 2005; Yang & Chen, 2008). Estudos demonstraram que a inibição da COX-2 reduz a LTP no hipocampo (Chen *et al.*, 2002). Esse efeito também foi observado no córtex visual (Akaneya & Tsumoto, 2006). A prostaglandina E2 (PGE2) é um dos principais produtos da via das COXs, regulando seletivamente

propriedades sinápticas importantes (Petrova *et al.*, 2007; Alix *et al.*, 2008). Chen e Bazan (2005) revelaram que a deleção da PGE2 endógena em neurônios do hipocampo de ratos gera fortes prejuízos na excitabilidade das membranas neuronais, afetando assim a somação temporal de PPSEs. Esses efeitos foram revertidos através da aplicação exógena de PGE2. Esse mecanismo de ação parece ser mediado por vias dependentes de AMPc, através da ativação de proteínas cinases, como a proteína cinase A (PKA) e PKC. A PGE2 apresenta 4 tipos de receptores pré-sinápticos, evocando respostas celulares por diferentes tipos de sinalização. O receptor EP2 parece ser o mais importante em eventos de LTP, visto que a menor expressão do receptor, através da utilização da técnica de RNA de interferência, silenciou as correntes pós-sinápticas excitatórias induzidas por PGE2. (Sang *et al.*, 2005). Neste sentido, a presença de COX-2 em espículas dendríticas e do fato do receptor EP2 ser encontrado em terminais pré-sinápticos, podemos inferir a ação da PGE2 como mensageiro retrógrado na regulação da transmissão sináptica.

Outro importante mediador lipídico relacionado com transmissão sináptica é o fator de agregação plaquetária (PAF). A ação da PLA2 sobre os fosfolipídios de membrana gera a liberação de AGE livre e do PAF na sua forma ainda inativa (liso-PAF). Quando estimulado, liso-PAF é acetilado e transformado na sua forma ativa, o PAF, podendo então atuar como mediador fisiológico (Chen & Bazan, 2005) (Bazan, 2005). Como mensageiro retrógrado, PAF é liberado do neurônio pós-sináptico, aumentando a neurotransmissão excitatória e assim, promovendo eficiência sináptica por indução de LTP. O PAF é um fosfolipídio que medeia a liberação de glutamato na LTP do hipocampo (Bazan *et al.*, 1997). Antagonistas

seletivos do receptor PAF tiveram a capacidade de inibir a indução de LTP na região CA1 do hipocampo, no giro denteado (Arai & Lynch, 1992; Kato *et al.*, 1994) e no córtex somatossensorial (Heusler & Boehmer, 2007).

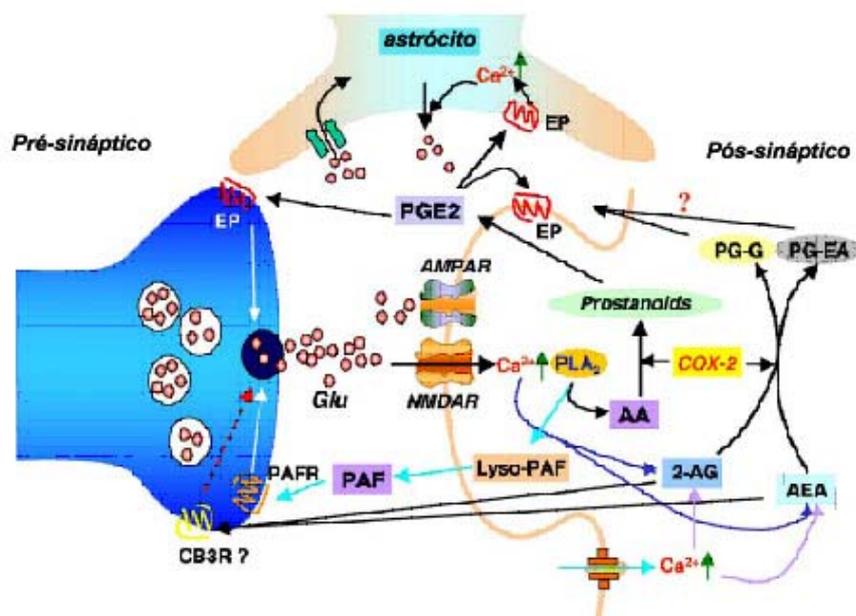


FIGURA 26: Representação da atividade retrógrada dos ácidos graxos essenciais (AGEs) e dos principais compostos bioativos. Os AGEs, principalmente o ácido araquidônico (AA) na sua forma livre podem ser liberados do neurônio pós-sináptico e atuar na célula pré-sináptica, regulando a liberação de neurotransmissores e eventos de sinalização celular. Os AGEs podem ainda serem modificados pela ação de enzimas como as COX, gerando a formação de eicosanóides que também podem atuar na sinalização retrógrada. Outros compostos lipídicos como PAF, participam da via do AA e podem também apresentar ação retrógrada. (Chen & Bazan, 2005)

5.4 Restrição nutricional de AGEs e impacto na expressão das subunidades GluR1 e GluR2 dos receptores AMPA

Os receptores AMPA são tetrâmeros que apresentam propriedades específicas. Podem ser homo ou heteroméricos dependendo da diversidade de composição de suas subunidades. Durante o desenvolvimento, a expressão do receptor AMPA (AMPA) funcional é observada em células com atividade

NMDAR já existente. A inserção de AMPAR dos estoques intracelulares para os sítios pós-sinápticos depende de LTP, com a ativação concomitante do terminal pré-sináptico (liberação de glutamato) e da célula pós-sináptica (despolarização), e conseqüente ativação de NMDAR. (Barry & Ziff, 2002). As concentrações de Ca^{2+} pós-sinápticos aumentam a inserção sináptica de AMPAR em situação de LTP, ou a retirada de AMPAR da fenda sináptica no caso de LTD (Boehm & Malinow, 2005). Dessa forma, o recrutamento sináptico de AMPAR é associado à maturação funcional das sinapses excitatórias. O aumento na taxa de correntes mediada por AMPAR, relativo ao receptor NMDA é uma das características que define a maturação das sinapses glutamatérgicas.

A concentração sináptica das subunidades é diferencialmente regulada durante processos de estabilização e maturação sináptica (Cohen-Cory, 2002). Neurônios hipocámpais de ratos adultos expressam primordialmente as subunidades GluR1, GluR2 e GluR3, com conformação preferencial pelos heterodímeros GluR1/GluR2, GluR2/GluR3. (Man *et al.*, 2000; Kessels & Malinow, 2009). Neste trabalho, estudamos os efeitos da restrição crônica de ácidos graxos essenciais na regulação da expressão das subunidades GluR1 e GluR2 dos receptores AMPA. Os animais restritos em ácidos graxos essenciais (AGE-) apresentaram aumento na expressão das duas subunidades dos receptores AMPA, GluR1 e GluR2, quando comparados com o grupo controle (AGE+) (FIGURAS 23 E 24) .

Em fases iniciais do desenvolvimento, sinapses glutamatérgicas expressam poucos receptores AMPA, compostos primordialmente por subunidades do tipo GluR1 (Shi *et al.*, 2001; Barry & Ziff, 2002). GluR2 é uma subunidade

determinante para a função de AMPAR, determinante de propriedades biofísicas como a cinética do receptor, condutância do canal e permeabilidade a cálcio. Em células onde o GluR2 é altamente expresso, a grande maioria dos AMPAR contém esta subunidade (Isaac *et al.*, 2007).

Os efeitos de aumento das subunidades de AMPAR em nossos resultados podem estar relacionados com o aumento de plasticidade de axônios retinotectais observado através do rompimento da topografia retinotectal. Portanto, a maior expressão de subunidades GLUR1 e GLUR2 poderia ser explicada pelo aumento do *turnover* sináptico no colículo superior.

Um dos principais mecanismos da atividade retrógrada dos AGEs é o seu papel na regulação da liberação de neurotransmissores, visto que já foi demonstrado que ácidos graxos na sua forma livre aumentavam a liberação de glutamato no hipocampo (Nishizaki *et al.*, 1999). Neste sentido, a restrição nutricional de AGEs, pode influenciar a atividade pré-sináptica, diminuindo a liberação de glutamato na fenda sináptica e conseqüentemente promover alterações pós-sinápticas, interferindo na atividade dos receptores glutamatérgicos. O aumento na expressão dessas subunidades, GluR1 e GluR2, sugere uma tentativa do sistema em inserir mais AMPAR nas membranas neuronais e permitir uma maior captação de glutamato pela célula pós-sináptica.

Outro fator importante são alterações provenientes da restrição de ácidos graxos essenciais na composição lipídica da membrana pós-sináptica. Modificações no microambiente lipídico do receptor podem influenciar sua conformação, promovendo mudanças na interação entre o receptor e seus ligantes. Alterações na composição de lipídios na membrana pós-sináptica podem

alterar a dinâmica de proteínas que levam a inserção de AMPAR nas sinapses (Massicotte, 2000).

Os efeitos da restrição nutricional de AGEs na regulação das subunidades de AMPAR ainda não são conclusivos, visto que não sabemos a relação de receptores que se encontram nas sinapses ou em sítios extra-sinápticos. Além disso, é relevante conhecer a expressão dos receptores NMDA e conhecer a relação entre NMDAR e AMPAR no CS dos animais AGE-, demonstrando de fato os efeitos da restrição nutricional na neurotransmissão glutamatérgica.

5.5 Efeitos dos AGEs na expressão da proteína GAP-43 fosforilada (pGAP-43)

Durante o desenvolvimento, a expressão da proteína GAP-43 é observada em cones de crescimento de axônios em expansão e em terminais pré-sinápticos imaturos. Apesar dos níveis de GAP-43 diminuírem após a maturação das conexões sinápticas na maior parte do cérebro, alguns neurônios continuam a expressar em grandes concentrações por toda a vida. O aumento na fosforilação da GAP-43 está associado com a persistência da LTP e aumento na liberação de neurotransmissores, promovendo modificações funcionais nos circuitos neurais. (Benowitz *et al.*, 1988; Benowitz *et al.*, 1989)

Buscamos investigar a expressão de proteínas GAP-43 fosforilada (pGAP-43) em animais adultos (DPN28) submetidos a alimentação com a dieta controle e a dieta restrição. O grupo AGE- obteve uma diminuição na expressão de pGAP-43 no CS desses animais, quando comparado com o grupo AGE+ (FIGURA 25). Este resultado sugere que a privação nutricional, refletindo assim em uma menor

liberação retrógrada de AGEs, interfere na estabilização sináptica por alterar a dinâmica do terminal pré-sináptico, promovendo uma menor atividade de GAP-43 e conseqüente regulação das proteínas do citoesqueleto.

Altas concentrações de DHA são encontradas no cone de crescimento de neuritos em crescimento. O DHA presente nos cones pode ser extremamente importante para um crescimento máximo dos neuritos durante o desenvolvimento e nos eventos de plasticidade sináptica. Em animais adultos, o DHA é encontrado nos dendritos neurais, onde pode estar envolvido na extensão e no estabelecimento da arborização dendrítica, processo que ocorre durante a formação da memória (Marszalek & Lodish, 2005). Trabalhos demonstram que os efeitos do DHA estão relacionados a mecanismos de regulação da expressão gênica, visto que a restrição nutricional por 15 semanas em ratos gera uma redução na atividade da proteína ligadora do elemento responsivo ao AMPc (CREB). O CREB atua na regulação de diversos genes, incluindo o fator neurotrófico associado ao cérebro (BDNF), cuja atividade facilita a transmissão sináptica e promove mecanismos de aprendizado e memória (Debski & Cline, 2002). A depleção de DHA diminui os níveis da proteína e do RNAm de BDNF no córtex pré-frontal de ratos (Rao *et al.*, 2007). Além disso, o DHA pode ser importante para uma eficiente regeneração dos axônios e dendritos após situações de injúria neural. Ratos submetidos à injúria traumática cerebral, quando suplementados com ácidos graxos ω -3, obtiveram redução no stress oxidativo no hipocampo, além da manutenção dos níveis de BDNF, sinapsina-I e CREB, preservando a função neural e a plasticidade sináptica (Wu *et al.*, 2004) (Marszalek & Lodish, 2005).

A sinalização retrógrada é importante durante o desenvolvimento dos circuitos cerebrais, visto que o receptor NMDA está envolvido na integração das informações nas células pós-sinápticas, de modo a estabilizar sinapses específicas (Constantine-Paton *et al.*, 1990). O bloqueio de NMDAR está associado ao aumento na dinâmica da árvore axonal, provavelmente por alterar a liberação de AA, gerando desestabilização dos contatos sinápticos, possivelmente por interferir na estabilização de F-actina. Essas interações são importantes no refinamento dependente de atividade das conexões, entre terminais pré-sinápticos com altos níveis de pGAP-43 e neurônios pós-sinápticos expressando NMDAR (Schaechter & Benowitz, 1993; Schmidt *et al.*, 2004).

O AA contribui para a manutenção da LTP, mediando a liberação de neurotransmissores através de mecanismos pré-sinápticos, pela ativação de PKC pré-sináptica. As isoformas de PKC são distribuídas pelos terminais pré e pós-sinápticos, sendo a PKC alfa localizada em células pré-sinápticas, a beta é encontrada em terminais pré e pós, enquanto que a PKC gama é encontrada em neurônios pós-sinápticos (Shearman *et al.*, 1991; Nishizaki *et al.*, 1999). PKC pré-sináptica ativa a GAP-43 durante a LTP, de modo que esse mecanismo é importante em eventos de plasticidade sináptica para promover o crescimento e estabilização de ramos específicos (Schmidt *et al.*, 2004).

A indução de LTP por estímulos de alta frequência aumenta significativamente a fosforilação de GAP-43 dependente de PKC em fatias de hipocampo de ratos adultos. O mesmo efeito não foi observado quando foi utilizado um antagonista do receptor NMDA, aplicado durante os estímulos de alta frequência, indicando que a expressão de GAP-43 fosforilada por PKC

depende da liberação de uma sinalização retrógrada pós-sináptica mediada por NMDA. A aplicação *in vitro* dos dois principais mensageiros retrógrados, AA e NO revelou que o AA é capaz de promover a translocação das isoformas de PKC α/β , induzindo fosforilação de GAP-43 nestas condições (Luo & Vallano, 1995). Este evento de fosforilação da GAP-43 por AA parece ter seu efeito aumentado na presença de Ca^{2+} , o que sugere que a atividade de AA depende de liberação de glutamato e da plena atividade de seus receptores (Schaechter & Benowitz, 1993).

A ativação de GAP-43 pela atividade retrógrada de AA é importante para modificações funcionais e estruturais das árvores dendríticas que permitem o estabelecimento dos terminais axonais em seus alvos específicos. Níveis diminuídos de GAP-43 podem promover eventos de enfraquecimento sináptico e diminuição na liberação de neurotransmissores, podendo ocasionar desestabilização sináptica e rompimento de topografia, diretamente relacionado com os resultados observados através da restrição nutricional crônica dos AGEs.

6 CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou os efeitos da restrição nutricional crônica de ácidos graxos essenciais (AGE) sobre a manutenção da topografia retinotectal de roedores em idades tardias do desenvolvimento, correlacionando os efeitos observados de reorganização das projeções ipsolaterais com a modulação de proteínas relacionadas a eventos de plasticidade sináptica.

- A restrição de AGE promove a ruptura da topografia retinotectal em animais DPN28. O grupo AGE⁻ apresentou desestabilização das projeções ipsolaterais com a consequente dispersão para regiões mais superficiais do colículo superior (CS), menor focalização dos aglomerados de marcação, além de um aumento na densidade de fibras entre os aglomerados.

- Foram observados os mesmos resultados em animais DPN42, três semanas após o término do período crítico, em que os animais alimentados com a dieta restrição exibiram espalhamento das projeções para regiões superficiais do CS e alterações na própria camada de aglomerados de marcação.

- Animais pertencentes ao grupo AGE⁻ mantidos por uma semana de sobrevida após lesão de retina temporal (DPN21-28) apresentaram efeitos expressivos de reorganização plástica das projeções retinotectais para as camadas mais superficiais do CS, sendo inclusive observado padrão bilaminar de marcação característico.

- A expressão da proteína GAP-43 na sua forma fosforilada (pGAP-43) diminuiu em animais restritos em AGE, sugerindo alterações na estabilização das conexões sinápticas.

- A restrição nutricional de AGE promoveu o aumento na expressão das subunidades do receptor AMPA, GluR1 e GluR2, sugerindo uma tentativa do sistema em se reorganizar e se estabilizar em contatos sinápticos inespecíficos.

7 Referências Bibliográficas

- Akaneya Y & Tsumoto T. (2006). Bidirectional trafficking of prostaglandin E2 receptors involved in long-term potentiation in visual cortex. *J Neurosci* **26**, 10209-10221.
- Alger BE. (2002). Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Prog Neurobiol* **68**, 247-286.
- Alix E, Schmitt C, Strazielle N & Ghersi-Egea JF. (2008). Prostaglandin E2 metabolism in rat brain: Role of the blood-brain interfaces. *Cerebrospinal Fluid Res* **5**, 5.
- Arai A & Lynch G. (1992). Antagonists of the Platelet-activating Factor Receptor Block Long-term Potentiation in Hippocampal Slices. *Eur J Neurosci* **4**, 411-419.
- Barry MF & Ziff EB. (2002). Receptor trafficking and the plasticity of excitatory synapses. *Curr Opin Neurobiol* **12**, 279-286.
- Bazan NG. (2003). Synaptic lipid signaling: significance of polyunsaturated fatty acids and platelet-activating factor. *J Lipid Res* **44**, 2221-2233.
- Bazan NG. (2005). Lipid signaling in neural plasticity, brain repair, and neuroprotection. *Mol Neurobiol* **32**, 89-103.
- Bazan NG, Packard MG, Teather L & Allan G. (1997). Bioactive lipids in excitatory neurotransmission and neuronal plasticity. *Neurochem Int* **30**, 225-231.
- Benowitz LI, Apostolides PJ, Perrone-Bizzozero N, Finklestein SP & Zwiers H. (1988). Anatomical distribution of the growth-associated protein GAP-43/B-50 in the adult rat brain. *J Neurosci* **8**, 339-352.
- Benowitz LI, Perrone-Bizzozero NI, Finklestein SP & Bird ED. (1989). Localization of the growth-associated phosphoprotein GAP-43 (B-50, F1) in the human cerebral cortex. *J Neurosci* **9**, 990-995.
- Berardi N, Pizzorusso T & Maffei L. (2000). Critical periods during sensory development. *Curr Opin Neurobiol* **10**, 138-145.
- Binns KE. (1999). The synaptic pharmacology underlying sensory processing in the superior colliculus. *Prog Neurobiol* **59**, 129-159.
- Blass JP & Gibson GE. (1999). Cerebrometabolic aspects of delirium in relationship to dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* **10**, 335-338.

- Bliss TV & Gardner-Medwin AR. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* **232**, 357-374.
- Boehm J & Malinow R. (2005). AMPA receptor phosphorylation during synaptic plasticity. *Biochem Soc Trans* **33**, 1354-1356.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Broadhurst CL, Wang Y, Crawford MA, Cunnane SC, Parkington JE & Schmidt WF. (2002). Brain-specific lipids from marine, lacustrine, or terrestrial food resources: potential impact on early African Homo sapiens. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **131**, 653-673.
- Butts DA. (2002). Retinal waves: implications for synaptic learning rules during development. *Neuroscientist* **8**, 243-253.
- Campello-Costa P, Fosse-Junior AM, Oliveira-Silva P & Serfaty CA. (2006). Blockade of arachidonic acid pathway induces sprouting in the adult but not in the neonatal uncrossed retinotectal projection. *Neuroscience* **139**, 979-989.
- Campello-Costa P, Fosse AM, Jr., Ribeiro JC, Paes-De-Carvalho R & Serfaty CA. (2000). Acute blockade of nitric oxide synthesis induces disorganization and amplifies lesion-induced plasticity in the rat retinotectal projection. *J Neurobiol* **44**, 371-381.
- Carlson SE. (2001). Docosahexaenoic acid and arachidonic acid in infant development. *Semin Neonatol* **6**, 437-449.
- Chalimoniuk M, Glowacka J, Zabiela A, Eckert A & Strosznajder JB. (2006). Nitric oxide alters arachidonic acid turnover in brain cortex synaptoneuroosomes. *Neurochem Int* **48**, 1-8.
- Chandrasekaran AR, Plas DT, Gonzalez E & Crair MC. (2005). Evidence for an instructive role of retinal activity in retinotopic map refinement in the superior colliculus of the mouse. *J Neurosci* **25**, 6929-6938.
- Chen C & Bazan NG. (2005). Lipid signaling: sleep, synaptic plasticity, and neuroprotection. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **77**, 65-76.
- Chen C, Magee JC & Bazan NG. (2002). Cyclooxygenase-2 regulates prostaglandin E2 signaling in hippocampal long-term synaptic plasticity. *J Neurophysiol* **87**, 2851-2857.

- Cline HT & Constantine-Paton M. (1990). NMDA receptor agonist and antagonists alter retinal ganglion cell arbor structure in the developing frog retinotectal projection. *J Neurosci* **10**, 1197-1216.
- Cohen-Cory S. (2002). The developing synapse: construction and modulation of synaptic structures and circuits. *Science* **298**, 770-776.
- Constantine-Paton M. (2000). The plastic brain. *Neurobiol Dis* **7**, 515-519.
- Constantine-Paton M, Cline HT & Debski E. (1990). Patterned activity, synaptic convergence, and the NMDA receptor in developing visual pathways. *Annu Rev Neurosci* **13**, 129-154.
- Cooper SJ. (2005). Donald O. Hebb's synapse and learning rule: a history and commentary. *Neurosci Biobehav Rev* **28**, 851-874.
- Cynader M, Shaw C, Prusky G & Van Huizen F. (1990). Neural mechanisms underlying modifiability of response properties in developing cat visual cortex. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* **67**, 85-108.
- Debski EA & Cline HT. (2002). Activity-dependent mapping in the retinotectal projection. *Curr Opin Neurobiol* **12**, 93-99.
- Debski EA, Cline HT & Constantine-Paton M. (1990). Activity-dependent tuning and the NMDA receptor. *J Neurobiol* **21**, 18-32.
- Dijk-Brouwer DA, Hadders-Algra M, Bouwstra H, Decsi T, Boehm G, Martini IA, Boersma ER & Muskiet FA. (2005). Lower fetal status of docosahexaenoic acid, arachidonic acid and essential fatty acids is associated with less favorable neonatal neurological condition. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **72**, 21-28.
- Dityatev A & Schachner M. (2003). Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* **4**, 456-468.
- Drescher U, Bonhoeffer F & Muller BK. (1997). The Eph family in retinal axon guidance. *Curr Opin Neurobiol* **7**, 75-80.
- Farkas E, de Wilde MC, Kiliaan AJ, Meijer J, Keijser JN & Luiten PG. (2002). Dietary long chain PUFAs differentially affect hippocampal muscarinic 1 and serotonergic 1A receptors in experimental cerebral hypoperfusion. *Brain Res* **954**, 32-41.
- Feller MB. (2002). The role of nAChR-mediated spontaneous retinal activity in visual system development. *J Neurobiol* **53**, 556-567.
- Fernstrom JD. (2000). Can nutrient supplements modify brain function? *Am J Clin Nutr* **71**, 1669S-1675S.

- Flanagan JG & Vanderhaeghen P. (1998). The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annu Rev Neurosci* **21**, 309-345.
- Garel S & Rubenstein JL. (2004). Intermediate targets in formation of topographic projections: inputs from the thalamocortical system. *Trends Neurosci* **27**, 533-539.
- Goodhill GJ & Richards LJ. (1999). Retinotectal maps: molecules, models and misplaced data. *Trends Neurosci* **22**, 529-534.
- Guan KL & Rao Y. (2003). Signalling mechanisms mediating neuronal responses to guidance cues. *Nat Rev Neurosci* **4**, 941-956.
- Haag M. (2003). Essential fatty acids and the brain. *Can J Psychiatry* **48**, 195-203.
- Heiduschka P & Thanos S. (2000). Restoration of the retinofugal pathway. *Prog Retin Eye Res* **19**, 577-606.
- Heird WC & Lapillonne A. (2005). The role of essential fatty acids in development. *Annu Rev Nutr* **25**, 549-571.
- Hensch TK. (2004). Critical period regulation. *Annu Rev Neurosci* **27**, 549-579.
- Heusler P & Boehmer G. (2007). Platelet-activating factor contributes to the induction of long-term potentiation in the rat somatosensory cortex in vitro. *Brain Res* **1135**, 85-91.
- Hilbig H, Bidmon HJ, Ettrich P & Muller A. (2000). Projection neurons in the superficial layers of the superior colliculus in the rat: a topographic and quantitative morphometric analysis. *Neuroscience* **96**, 109-119.
- Hofbauer A & Drager UC. (1985). Depth segregation of retinal ganglion cells projecting to mouse superior colliculus. *J Comp Neurol* **234**, 465-474.
- Holt CE & Harris WA. (1993). Position, guidance, and mapping in the developing visual system. *J Neurobiol* **24**, 1400-1422.
- Horsburgh GM & Sefton AJ. (1986). The early development of the optic nerve and chiasm in embryonic rat. *J Comp Neurol* **243**, 547-560.
- Hubel DH & Wiesel TN. (1962). Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *J Physiol* **160**, 106-154.
- Iannazzo L. (2001). Involvement of B-50 (GAP-43) phosphorylation in the modulation of transmitter release by protein kinase C. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **28**, 901-904.

- Isa T & Saito Y. (2001). The direct visuo-motor pathway in mammalian superior colliculus; novel perspective on the interlaminar connection. *Neurosci Res* **41**, 107-113.
- Isaac JT, Ashby M & McBain CJ. (2007). The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. *Neuron* **54**, 859-871.
- Kato K, Clark GD, Bazan NG & Zorumski CF. (1994). Platelet-activating factor as a potential retrograde messenger in CA1 hippocampal long-term potentiation. *Nature* **367**, 175-179.
- Katz LC & Crowley JC. (2002). Development of cortical circuits: lessons from ocular dominance columns. *Nat Rev Neurosci* **3**, 34-42.
- Kessels HW & Malinow R. (2009). Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior. *Neuron* **61**, 340-350.
- Knoll B & Drescher U. (2002). Ephrin-As as receptors in topographic projections. *Trends Neurosci* **25**, 145-149.
- Koletzko B, Lien E, Agostoni C, Bohles H, Campoy C, Cetin I, Decsi T, Dudenhausen JW, Dupont C, Forsyth S, Hoesli I, Holzgreve W, Lapillonne A, Putet G, Secher NJ, Symonds M, Szajewska H, Willatts P & Uauy R. (2008). The roles of long-chain polyunsaturated fatty acids in pregnancy, lactation and infancy: review of current knowledge and consensus recommendations. *J Perinat Med* **36**, 5-14.
- Lau CG & Zukin RS. (2007). NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* **8**, 413-426.
- Lemke G & Reber M. (2005). Retinotectal mapping: new insights from molecular genetics. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 551-580.
- Leu BH & Schmidt JT. (2008). Arachidonic acid as a retrograde signal controlling growth and dynamics of retinotectal arbors. *Dev Neurobiol* **68**, 18-30.
- Linden R & Perry VH. (1983). Massive retinotectal projection in rats. *Brain Res* **272**, 145-149.
- Linden R & Serfaty CA. (1985). Evidence for differential effects of terminal and dendritic competition upon developmental neuronal death in the retina. *Neuroscience* **15**, 853-868.
- Liu X & Chen C. (2008). Different roles for AMPA and NMDA receptors in transmission at the immature retinogeniculate synapse. *J Neurophysiol* **99**, 629-643.

- Lo FS & Mize RR. (2002). Properties of LTD and LTP of retinocollicular synaptic transmission in the developing rat superior colliculus. *Eur J Neurosci* **15**, 1421-1432.
- Lu W & Constantine-Paton M. (2004). Eye opening rapidly induces synaptic potentiation and refinement. *Neuron* **43**, 237-249.
- Lund RD, Land PW & Boles J. (1980). Normal and abnormal uncrossed retinotectal pathways in rats: an HRP study in adults. *J Comp Neurol* **189**, 711-720.
- Lund RD & Lund JS. (1976). Plasticity in the developing visual system: the effects of retinal lesions made in young rats. *J Comp Neurol* **169**, 133-154.
- Luo Y & Vallano ML. (1995). Arachidonic acid, but not sodium nitroprusside, stimulates presynaptic protein kinase C and phosphorylation of GAP-43 in rat hippocampal slices and synaptosomes. *J Neurochem* **64**, 1808-1818.
- Maffei L & Galli-Resta L. (1990). Correlation in the discharges of neighboring rat retinal ganglion cells during prenatal life. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 2861-2864.
- Man HY, Ju W, Ahmadian G & Wang YT. (2000). Intracellular trafficking of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Cell Mol Life Sci* **57**, 1526-1534.
- Marszalek JR & Lodish HF. (2005). Docosahexaenoic acid, fatty acid-interacting proteins, and neuronal function: breastmilk and fish are good for you. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 633-657.
- Massicotte G. (2000). Modification of glutamate receptors by phospholipase A2: its role in adaptive neural plasticity. *Cell Mol Life Sci* **57**, 1542-1550.
- McLaughlin T & O'Leary DD. (2005). Molecular gradients and development of retinotopic maps. *Annu Rev Neurosci* **28**, 327-355.
- Meister M, Wong RO, Baylor DA & Shatz CJ. (1991). Synchronous bursts of action potentials in ganglion cells of the developing mammalian retina. *Science* **252**, 939-943.
- Mellitzer G, Xu Q & Wilkinson DG. (2000). Control of cell behaviour by signalling through Eph receptors and ephrins. *Curr Opin Neurobiol* **10**, 400-408.
- Mesulam MM. (1978). Tetramethyl benzidine for horseradish peroxidase neurohistochemistry: a non-carcinogenic blue reaction product with superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents. *J Histochem Cytochem* **26**, 106-117.

- Meyer RL. (1998). Roger Sperry and his chemoaffinity hypothesis. *Neuropsychologia* **36**, 957-980.
- Micheva KD, Buchanan J, Holz RW & Smith SJ. (2003). Retrograde regulation of synaptic vesicle endocytosis and recycling. *Nat Neurosci* **6**, 925-932.
- Mize RR & Lo F. (2000). Nitric oxide, impulse activity, and neurotrophins in visual system development(1). *Brain Res* **886**, 15-32.
- Molotchnikoff S & Itaya SK. (1993). Functional development of the neonatal rat retinotectal pathway. *Brain Res Dev Brain Res* **72**, 300-304.
- Mooney RD, Huang X & Rhoades RW. (1992). Functional influence of interlaminar connections in the hamster's superior colliculus. *J Neurosci* **12**, 2417-2432.
- Morgane PJ, Austin-LaFrance R, Bronzino J, Tonkiss J, Diaz-Cintra S, Cintra L, Kemper T & Galler JR. (1993). Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev* **17**, 91-128.
- Mrsic-Flogel TD, Hofer SB, Creutzfeldt C, Cloez-Tayarani I, Changeux JP, Bonhoeffer T & Hubener M. (2005). Altered map of visual space in the superior colliculus of mice lacking early retinal waves. *J Neurosci* **25**, 6921-6928.
- Nakahara H, Morita K, Wurtz RH & Optican LM. (2006). Saccade-related spread of activity across superior colliculus may arise from asymmetry of internal connections. *J Neurophysiol* **96**, 765-774.
- Nishizaki T, Matsuoka T, Nomura T, Enikolopov G & Sumikawa K. (1999). Arachidonic acid potentiates currents through Ca²⁺-permeable AMPA receptors by interacting with a CaMKII pathway. *Brain Res Mol Brain Res* **67**, 184-189.
- Oliveira-Silva P, Jurgilas PB, Trindade P, Campello-Costa P, Perales J, Savino W & Serfaty CA. (2007). Matrix metalloproteinase-9 is involved in the development and plasticity of retinotectal projections in rats. *Neuroimmunomodulation* **14**, 144-149.
- Parsons MJ, Benca RM, Brownfield MS & Behan M. (2001). Age-associated changes in the serotonergic system in rat superior colliculus and pretectum. *Brain Res Bull* **55**, 435-444.
- Penn AA & Shatz CJ. (1999). Brain waves and brain wiring: the role of endogenous and sensory-driven neural activity in development. *Pediatr Res* **45**, 447-458.

- Petrova LN, Gabrelian AV, Serkov IV & Bachurin SO. (2007). Effect of prostaglandins E2 and D2 on presynaptic NMDA receptors in rat cerebral cortex. *Bull Exp Biol Med* **144**, 298-300.
- Rao JS, Ertley RN, Lee HJ, DeMar JC, Jr., Arnold JT, Rapoport SI & Bazinet RP. (2007). n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation in rats decreases frontal cortex BDNF via a p38 MAPK-dependent mechanism. *Mol Psychiatry* **12**, 36-46.
- Reese BE & Colello RJ. (1992). Neurogenesis in the retinal ganglion cell layer of the rat. *Neuroscience* **46**, 419-429.
- Reeves PG, Nielsen FH & Fahey GC, Jr. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* **123**, 1939-1951.
- Richardson AJ & Puri BK. (2000). The potential role of fatty acids in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **63**, 79-87.
- Ruthazer ES & Cline HT. (2004). Insights into activity-dependent map formation from the retinotectal system: a middle-of-the-brain perspective. *J Neurobiol* **59**, 134-146.
- Sabatini BL, Maravall M & Svoboda K. (2001). Ca(2+) signaling in dendritic spines. *Curr Opin Neurobiol* **11**, 349-356.
- Sang N, Zhang J, Marcheselli V, Bazan NG & Chen C. (2005). Postsynaptically synthesized prostaglandin E2 (PGE2) modulates hippocampal synaptic transmission via a presynaptic PGE2 EP2 receptor. *J Neurosci* **25**, 9858-9870.
- Schaechter JD & Benowitz LI. (1993). Activation of protein kinase C by arachidonic acid selectively enhances the phosphorylation of GAP-43 in nerve terminal membranes. *J Neurosci* **13**, 4361-4371.
- Schmidt JT. (1990). Long-term potentiation and activity-dependent retinotopic sharpening in the regenerating retinotectal projection of goldfish: common sensitive period and sensitivity to NMDA blockers. *J Neurosci* **10**, 233-246.
- Schmidt JT, Fleming MR & Leu B. (2004). Presynaptic protein kinase C controls maturation and branch dynamics of developing retinotectal arbors: possible role in activity-driven sharpening. *J Neurobiol* **58**, 328-340.
- Schmidt JT & Tieman SB. (1985). Eye-specific segregation of optic afferents in mammals, fish, and frogs: the role of activity. *Cell Mol Neurobiol* **5**, 5-34.

- Schulte D & Bumsted-O'Brien KM. (2008). Molecular mechanisms of vertebrate retina development: implications for ganglion cell and photoreceptor patterning. *Brain Res* **1192**, 151-164.
- Serfaty CA, Campello-Costa P & Linden R. (2005). Rapid and long-term plasticity in the neonatal and adult retinotectal pathways following a retinal lesion. *Brain Res Bull* **66**, 128-134.
- Serfaty CA & Linden R. (1994). Development of abnormal lamination and binocular segregation in the retinotectal pathways of the rat. *Brain Res Dev Brain Res* **82**, 35-44.
- Shah RD & Crair MC. (2008). Retinocollicular synapse maturation and plasticity are regulated by correlated retinal waves. *J Neurosci* **28**, 292-303.
- Shatz CJ. (1992). The developing brain. *Sci Am* **267**, 60-67.
- Shatz CJ. (1996). Emergence of order in visual system development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 602-608.
- Shatz CJ & Stryker MP. (1978). Ocular dominance in layer IV of the cat's visual cortex and the effects of monocular deprivation. *J Physiol* **281**, 267-283.
- Shatz CJ & Stryker MP. (1988). Prenatal tetrodotoxin infusion blocks segregation of retinogeniculate afferents. *Science* **242**, 87-89.
- Shearman MS, Shinomura T, Oda T & Nishizuka Y. (1991). Protein kinase C subspecies in adult rat hippocampal synaptosomes. Activation by diacylglycerol and arachidonic acid. *FEBS Lett* **279**, 261-264.
- Sheng M & Kim MJ. (2002). Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms. *Science* **298**, 776-780.
- Shi S, Hayashi Y, Esteban JA & Malinow R. (2001). Subunit-specific rules governing AMPA receptor trafficking to synapses in hippocampal pyramidal neurons. *Cell* **105**, 331-343.
- Simon DK & O'Leary DD. (1992). Development of topographic order in the mammalian retinocollicular projection. *J Neurosci* **12**, 1212-1232.
- Singh M. (2005). Essential fatty acids, DHA and human brain. *Indian J Pediatr* **72**, 239-242.
- Sjostrom PJ, Rancz EA, Roth A & Hausser M. (2008). Dendritic excitability and synaptic plasticity. *Physiol Rev* **88**, 769-840.
- Smith WL. (2008). Nutritionally essential fatty acids and biologically indispensable cyclooxygenases. *Trends Biochem Sci* **33**, 27-37.

- Spolidoro M, Sale A, Berardi N & Maffei L. (2009). Plasticity in the adult brain: lessons from the visual system. *Exp Brain Res* **192**, 335-341.
- Townsend M, Liu Y & Constantine-Paton M. (2004). Retina-driven dephosphorylation of the NR2A subunit correlates with faster NMDA receptor kinetics at developing retinocollicular synapses. *J Neurosci* **24**, 11098-11107.
- Uauy R & Castillo C. (2003). Lipid requirements of infants: implications for nutrient composition of fortified complementary foods. *J Nutr* **133**, 2962S-2972S.
- Uauy R, Mena P & Rojas C. (2000). Essential fatty acids in early life: structural and functional role. *Proc Nutr Soc* **59**, 3-15.
- Wainwright PE. (2002). Dietary essential fatty acids and brain function: a developmental perspective on mechanisms. *Proc Nutr Soc* **61**, 61-69.
- Warton SS & Jones DG. (1985). Postnatal development of the superficial layers in the rat superior colliculus: a study with Golgi-Cox and Kluver-Barrera techniques. *Exp Brain Res* **58**, 490-502.
- Wigstrom H & Gustafsson B. (1985). On long-lasting potentiation in the hippocampus: a proposed mechanism for its dependence on coincident pre- and postsynaptic activity. *Acta Physiol Scand* **123**, 519-522.
- Wong RO, Meister M & Shatz CJ. (1993). Transient period of correlated bursting activity during development of the mammalian retina. *Neuron* **11**, 923-938.
- Wu A, Ying Z & Gomez-Pinilla F. (2004). Dietary omega-3 fatty acids normalize BDNF levels, reduce oxidative damage, and counteract learning disability after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* **21**, 1457-1467.
- Yang H & Chen C. (2008). Cyclooxygenase-2 in synaptic signaling. *Curr Pharm Des* **14**, 1443-1451.
- Yates PA, Roskies AL, McLaughlin T & O'Leary DD. (2001). Topographic-specific axon branching controlled by ephrin-As is the critical event in retinotectal map development. *J Neurosci* **21**, 8548-8563.
- Youdim KA, Martin A & Joseph JA. (2000). Essential fatty acids and the brain: possible health implications. *Int J Dev Neurosci* **18**, 383-399.
- Zilberter Y, Harkany T & Holmgren CD. (2005). Dendritic release of retrograde messengers controls synaptic transmission in local neocortical networks. *Neuroscientist* **11**, 334-344.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)